



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0057326
(43) 공개일자 2014년05월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/22 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-7006579
(22) 출원일자(국제) 2012년08월16일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2014년03월12일
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/051033
(87) 국제공개번호 WO 2013/025853
국제공개일자 2013년02월21일
(30) 우선권주장
61/524,421 2011년08월17일 미국(US)

(71) 출원인
제넨테크, 인크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우
쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
(72) 발명자
잭슨, 에리카
미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔
에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내
세이퍼, 가브리엘레
미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔
에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내
우, 안
미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔
에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내
(74) 대리인
위혜숙, 양영준

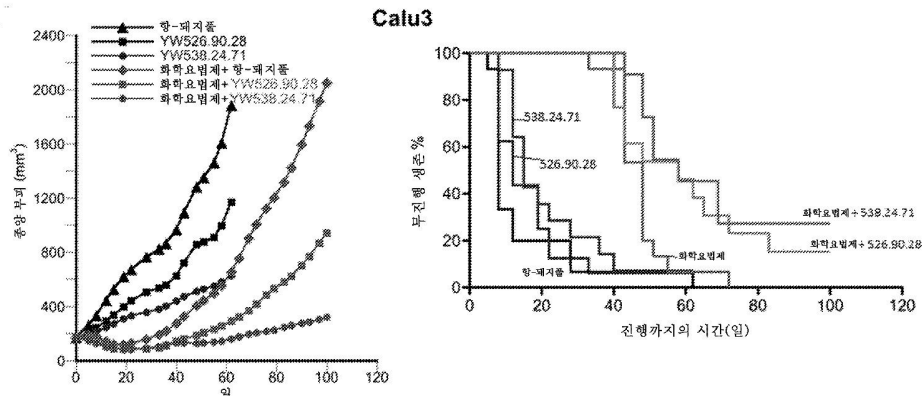
전체 청구항 수 : 총 44 항

(54) 발명의 명칭 뉴레글린 항체 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 항-뉴레글린1 항체 및 질환 또는 장애, 예컨대 암을 치료하는데 상기 항체를 사용하는 방법을 제공한다. 특정한 실시양태에서, 항-뉴레글린1 항체는 뉴레글린1 α 및 뉴레글린 1 β 이소형 둘 다에 결합한다.

대표도



특허청구의 범위

청구항 1

뉴레굴린1 α 및 뉴레굴린1 β 에 결합하는 단리된 항-NRG1 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 뉴레굴린1 β 의 EGF 도메인 및 뉴레굴린1 α 의 EGF 도메인에 결합하는 항체.

청구항 3

제2항에 있어서, 뉴레굴린1 α 의 EGF 도메인에 결합하는 친화도보다 20배, 50배, 100배, 200배, 500배 또는 1000배 더 큰 친화도로 뉴레굴린1 β 의 EGF 도메인에 결합하는 항체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴레굴린1 β 의 EGF 도메인에 10 nM 이하의 kD로 결합하고 뉴레굴린1 α 의 EGF 도메인에 10 nM 이하의 kD로 결합하는 항체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴레굴린1 β 의 EGF 도메인에 10 nM 이하, 1 nM 이하, 1×10^{-1} nM, 1×10^{-2} nM 또는 1×10^{-3} nM의 kD로 결합하는 항체.

청구항 6

제3항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 친화도가 표면 플라즈몬 공명 검정에 의해 측정되는 것인 항체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴레굴린1 β 의 에피토프에 결합하며, 여기서 상기 뉴레굴린1 β 의 에피토프가 서열 4의 아미노산 1-37의 아미노산 서열 또는 서열 4의 아미노산 38-64의 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체.

청구항 8

제7항에 있어서, 뉴레굴린1 β 의 에피토프가 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서, 뉴레굴린1 α 의 에피토프에 추가로 결합하며, 여기서 상기 뉴레굴린1 α 의 에피토프가 서열 3의 아미노산 1-36의 아미노산 서열 또는 서열 3의 아미노산 37-58의 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체.

청구항 10

제9항에 있어서, 뉴레굴린1 α 의 에피토프가 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 모노클로날 항체인 항체.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 인간, 인간화 또는 키메라 항체인 항체.

청구항 13

(a) 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (c) 서열

7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 단리된 항-NRG1 항체.

청구항 14

(a) 서열 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (b) 서열 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (c) 서열 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 단리된 항-NRG1 항체.

청구항 15

제13항에 있어서, (a) 서열 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (b) 서열 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (c) 서열 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 추가로 포함하는 항체.

청구항 16

(a) 서열 76의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열 29의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (c) 서열 43의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 단리된 항-NRG1 항체.

청구항 17

(a) 서열 31의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (b) 서열 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (c) 서열 33의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 단리된 항-NRG1 항체.

청구항 18

제16항에 있어서, (a) 서열 31의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (b) 서열 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (c) 서열 33의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 추가로 포함하는 항체.

청구항 19

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, (a) 서열 21의 아미노산 서열에 대해 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 VH 서열; (b) 서열 26의 아미노산 서열에 대해 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 VL 서열; 또는 (c) (a)에 서와 같은 VH 서열 및 (b)에서와 같은 VL 서열을 포함하는 항체.

청구항 20

서열 21의 VH 서열 및 서열 26의 VL 서열을 포함하는 단리된 항-NRG1 항체.

청구항 21

서열 53의 VH 서열 및 서열 63의 VL 서열을 포함하는 단리된 항-NRG1 항체.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항의 항체를 코딩하는 단리된 핵산.

청구항 23

제22항의 핵산을 포함하는 숙주 세포.

청구항 24

항체가 생산되도록 제23항의 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, 항체를 생산하는 방법.

청구항 25

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항의 항체 및 세포독성제를 포함하는 면역접합체.

청구항 26

제1항 내지 제21항 중 한 항의 항체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 제제.

청구항 27

제26항에 있어서, 추가의 치료제를 추가로 포함하는 제약 제제.

청구항 28

제27항에 있어서, 추가의 치료제가 겐시타빈, 파클리탁셀 또는 시스플라틴, 또는 파클리탁셀 및 시스플라틴의 조합인 제약 제제.

청구항 29

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 의약으로 사용하기 위한 항체.

청구항 30

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 암을 치료하는데 사용하기 위한 항체.

청구항 31

의약의 제조에 있어서 제1항 내지 제21항 중 어느 한 항의 항체의 용도.

청구항 32

제31항에 있어서, 의약이 암의 치료를 위한 것인 용도.

청구항 33

제30항 또는 제32항에 있어서, 암이 비소세포 폐암, 유방암, 난소암, 두경부암, 자궁경부암, 방광암, 식도암, 전립선암 및 결장직장암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 항체 또는 용도.

청구항 34

암을 갖는 개체에게 유효량의 제1항 내지 제21항 중 어느 한 항의 항체를 투여하는 것을 포함하는, 암을 갖는 개체를 치료하는 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 암이 비소세포 폐암, 유방암, 난소암, 두경부암, 자궁경부암, 방광암, 식도암, 전립선암 및 결장직장암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 36

제34항 또는 제35항에 있어서, 개체에게 추가의 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 추가의 치료제가 겐시타빈, 파클리탁셀, 카르보플라틴 및 시스플라틴, 또는 파클리탁셀, 카르보플라틴 및 시스플라틴 중 2개 또는 3개 모두의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 38

암 환자에게 유효량의 제1항 내지 제21항 중 어느 한 항의 항체를 투여하는 것을 포함하는, 암 환자에서 종양 재발까지의 시간을 증가시키는 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, 환자에게 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 치료제가 화학요법제 또는 제2 항체인 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 화학요법제가 겐시타빈, 파클리탁셀, 카르보플라틴 및 시스플라틴, 또는 파클리탁셀, 카르보

플라틴 및 시스플라틴 중 2개 또는 3개 모두의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 42

제40항에 있어서, 제2 항체가 EGFR, HER2, HER3 또는 HER4로 이루어진 군으로부터 선택된 표적에 결합하거나 또는 EGFR, HER2, HER3 또는 HER4로 이루어진 군으로부터 선택된 표적 중 2개 이상에 결합하는 것인 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 암이 비소세포 폐암, 유방암, 난소암, 두경부암, 자궁경부암, 방광암, 식도암, 전립선암 및 결장직장암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 44

제38항에 있어서, 종양 재발까지의 시간의 증가가 항체의 부재 하의 재발까지의 시간보다 적어도 1.25배 더 크거나 또는 적어도 1.50배 더 큰 것인 방법.

명세서

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본원은 2011년 8월 17일에 출원된 미국 특허 가출원 61/524,421을 우선권 주장하며, 그의 전체 개시내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 서열 목록

[0004] 본원은 EFS-웹을 통해 ASCII 포맷으로 제출된 서열 목록을 함유하며, 그의 전체내용이 본원에 참조로 포함된다. 2012년 8월 14일에 생성된 상기 ASCII 복사본은 P4727R1WO_ST25.txt로 명명되고, 크기는 64,664 바이트이다.

[0005] 발명의 분야

[0006] 본 발명은 뉴레클린 항체, 및 질환 또는 장애, 예컨대 암을 치료하는데 상기 항체를 사용하는 방법을 제공한다.

배경 기술

[0007] 대부분의 암에서, 화학요법에 대한 불량한 반응 또는 화학요법 후의 질환 재발이 사망률의 주요 원인이다. 이는 특히 화학요법이 모든 병기의 환자를 치료하는데 사용되기 때문에 비소세포 폐암 (NSCLC)과 관련된다. 환자 중 3분의 2 초과에서 절제불가능한 진행된 질환이 나타나고, 이들은 1차 화학요법, 방사선 또는 이들 둘의 조합으로 치료된다. 그러나, NSCLC의 치료에서 화학요법의 공격적인 사용에도 불구하고, 5-년 생존율은 국부 진행성 및 진행성 질환 각각에 대해 8% 및 3.5%로 남아있다 (Doebele et al.).

[0008] 화학요법에 대한 부분 반응 및 화학요법 후의 재발은 종양 세포가 그의 약물 감수성에서 이질성임을 시사한다. 일부 종양 세포는 주어진 작용제에 의해 효과적으로 사멸되는 반면 다른 것은 남아있다. 암 줄기 세포 (CSC)는 이들이 기존 요법의 실패에 대한 가능한 설명을 제공하기 때문에 최근 몇 년간 집중적으로 연구된 영역이었다. 여러 그룹에서 CSC가 종래의 화학요법제 및 방사선 치료에 대해 증진된 내성을 나타내는 것으로 보고되었다 (Bao et al., 2006; Costello et al., 2000; Dean et al., 2005; Dylla et al., 2008; Matsui et al., 2004; Phillips et al., 2006). 그러나, 원발성 또는 원위 부위에서 확립된 종양의 성장의 유지 또는 화학요법 후의 종양의 재개시에 있어 CSC의 역할은 결정되도록 남아있다. 화학요법 후의 종양 재성장을 담당하는 세포는 줄기 세포가 전혀 아닐 수 있고, 오히려 세포 주기의 단계, 기질-적소 상호작용, 또는 생존촉진 신호의 수준을 반영할 수 있는 다른 특성을 통해 내성을 달성하는 세포일 수 있다. 이러한 세포는 "종양 재개시 세포" 또는 TRIC로 지칭된다. 미국 특허 공개 20110229493.

[0009] 표피 성장 인자 수용체 (EGFR) 억제제는 NSCLC 환자를 치료하기 위해 빈번하게 사용되고, 그의 종양이 EGFR-활성화 돌연변이를 보유하는 대부분의 환자를 치료하는데 효과적인 것으로 밝혀졌다. 과다발현 또는 활성화 돌연변이를 통한 EGFR 신호전달의 탈조절은 폐 선암종에서 상대적으로 빈번한 사건이다 ((Dahabreh et al., 2010)에 검토됨). EGFR은 티로신 키나제의 ErbB 또는 HER-패밀리의 원형 구성원이며, 이는 EGFR (HER1), HER2, HER3 및 HER4를 포함한다. 최근의 증거는 다른 HER 패밀리의 구성원이 또한 NSCLC에서 소정의 역할을 수행한다는

것을 보여준다. 그러나, 질환에 대한 이들의 기여는 보다 덜 잘 특성화되어 있고, 대부분의 연구는 이들이 EGFR 신호전달을 활성화시키는 능력에 집중되어 있다 (Ding et al., 2008; Johnson and Janne, 2006; Kuyama et al., 2008; Zhou et al., 2006). 뉴레굴린 1 (NRG1) (또한, 헤레굴린1로도 지칭됨)은 HER3 및 HER4 수용체에 대한 리간드이다.

[0010] 뉴레굴린 패밀리의 4가지 기지의 구성원, NRG1, NRG2, NRG3 및 NRG4가 존재한다 (Falls 2003; Hirsch and Wu 2007). NRG1 전사체는 광범위한 대안적 스플라이싱을 거쳐 적어도 15개의 상이한 이소형을 발생시킨다. 모든 활성 이소형은 활성화에 필요하고 충분한 EGF-유사 도메인을 공유한다 (Holmes 1992, Yarden 1991).

[0011] NRG1 자가분비 신호전달은 폐 상피 세포 증식을 조절하고 인간 폐 발생에서 소정의 역할을 수행하는 것으로 밝혀졌으며 (Patel et al., 2000), EGFR 억제제에 대한 NSCLC의 비감수성과 관련된다 (Zhou et al., 2006).

발명의 내용

[0012] 본 발명은 항-뉴레굴린1 (항-NRG1) 항체 및 그의 사용 방법을 제공한다.

[0013] 본 발명의 한 측면은 뉴레굴린1 α 및 뉴레굴린1 β 에 결합하는 단리된 항-NRG1 항체를 제공한다. 한 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 뉴레굴린1 β 의 EGF 도메인 및 뉴레굴린1 α 의 EGF 도메인에 결합한다. 한 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 뉴레굴린1 α 의 EGF 도메인에 결합하는 친화도보다 더 큰 친화도로 뉴레굴린1 β 의 EGF 도메인에 결합한다. 구체적 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 뉴레굴린1 α 의 EGF 도메인에 결합하는 친화도보다 20배, 50배, 100배, 200배, 500배, 1000배 더 큰 친화도로 EGF 도메인 뉴레굴린1 β 에 결합한다.

[0014] 한 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 뉴레굴린1 β 의 EGF 도메인에 10 nM 이하의 kD로 결합하고, 뉴레굴린1 α 의 EGF 도메인에 10 nM 이하의 kD로 결합한다. 구체적 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 뉴레굴린1 β 의 EGF 도메인에 10 nM 이하, 1 nM 이하, 1×10^{-1} nM 이하, 1×10^{-2} nM 이하 또는 1×10^{-3} nM 이하의 kD로 결합한다. 항-NRG1 항체의 친화도는 한 실시양태에서 표면 플라즈몬 공명 검정에 의해 측정된다.

[0015] 본 발명의 한 측면은 뉴레굴린1 β 의 에피토프에 결합하는 단리된 항-NRG1 항체를 제공하며, 여기서 뉴레굴린1 β 의 에피토프는 서열 4의 아미노산 1-37의 아미노산 서열 또는 서열 4의 아미노산 38-64의 아미노산 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 뉴레굴린1 β 의 에피토프는 서열 4의 아미노산 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 뉴레굴린1 α 의 에피토프에 추가로 결합하며, 여기서 뉴레굴린1 α 의 에피토프는 서열 3의 아미노산 1-36의 아미노산 서열 또는 서열 3의 아미노산 37-58의 아미노산 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 뉴레굴린1 α 의 에피토프는 서열 3의 아미노산 서열을 포함한다.

[0016] 특정 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 모노클로날 항체이다. 특정 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 인간, 인간화 또는 키메라 항체이다. 특정 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 뉴레굴린1 α 및 뉴레굴린1 β 에 결합하는 항체 단편이다.

[0017] 본 발명의 또 다른 측면은 (a) 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (c) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 단리된 항-NRG1 항체를 제공한다.

[0018] 본 발명의 또 다른 측면은 (a) 서열 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (b) 서열 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (c) 서열 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 단리된 항-NRG1 항체를 제공한다. 한 실시양태에서, 항-NRG1은 (a) 서열 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (b) 서열 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (c) 서열 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 추가로 포함한다.

[0019] 본 발명의 또 다른 측면은 (a) 서열 76의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열 29의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (c) 서열 43의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 단리된 항-NRG1 항체를 제공한다.

[0020] 본 발명의 또 다른 측면은 (a) 서열 31의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (b) 서열 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (c) 서열 33의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 단리된 항-NRG1 항체를 제공한다. 한 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 (a) 서열 31의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (b) 서열 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (c) 서열 33의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 추가로 포함한다.

[0021] 본 발명의 또 다른 측면은 (a) 서열 21의 아미노산 서열에 대해 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 VH 서열; (b) 서열 26의 아미노산 서열에 대해 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 VL 서열; 또는 (c) (a)에서와 같은 VH 서열 및 (b)에서와 같은 VL 서열을 포함하는 단리된 항-NRG1 항체를 제공한다. 한 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 서

열 21의 VH 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 서열 26의 VL 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 서열 21의 VH 서열 및 서열 26의 VL 서열을 포함한다.

- [0022] 본 발명의 한 측면은 서열 53의 VH 서열 및 서열 63의 VL 서열을 포함하는 단리된 항-NRG1 항체를 제공한다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 측면은 항-NRG1 항체를 코딩하는 단리된 핵산을 제공한다. 본 발명의 또 다른 측면은 항-NRG1 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를 제공한다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 측면은 항-NRG1 항체가 생산되도록 이러한 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, 항-NRG1 항체를 생산하는 방법을 제공한다.
- [0025] 본 발명의 또 다른 측면은 항-NRG1 항체 및 세포독성제를 포함하는 면역접합체를 제공한다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 측면은 항-NRG1 항체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 제제를 제공한다. 한 실시양태에서, 제약 제제는 추가의 치료제, 예컨대 겐시타빈, 파클리탁셀 또는 시스플라틴, 또는 파클리탁셀 및 시스플라틴의 조합을 추가로 포함한다.
- [0027] 본 발명의 또 다른 측면은 의약으로 사용하기 위한 항-NRG1 항체를 제공한다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 측면은 암을 치료하는데 사용하기 위한 항-NRG1 항체를 제공한다.
- [0029] 본 발명의 또 다른 측면은 의약의 제조에 있어 항-NRG1 항체를 제공한다. 한 실시양태에서, 의약은 암, 예컨대 비소세포 폐암, 유방암, 난소암, 두경부암, 자궁경부암, 방광암, 식도암, 전립선암 및 결장직장암의 치료를 위한 것이다.
- [0030] 본 발명의 또 다른 측면은 암을 갖는 개체에게 유효량의 항-NRG1 항체를 투여하는 것을 포함하는, 암을 갖는 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 치료할 암은 예를 들어 비소세포 폐암, 유방암, 난소암, 두경부암, 자궁경부암, 방광암, 식도암, 전립선암 및 결장직장암이다. 한 실시양태에서, 방법은 개체에게 추가의 치료제, 예컨대 겐시타빈, 파클리탁셀, 카르보플라틴 및 시스플라틴, 또는 파클리탁셀, 카르보플라틴 및 시스플라틴 중 2개 또는 3개 모두의 조합을 투여하는 것을 추가로 포함한다.
- [0031] 본 발명의 또 다른 측면은 암 환자에게 유효량의 항-NRG1 항체를 투여하는 것을 포함하는, 암 환자에서 종양 재발까지의 시간을 증가시키는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 방법은 치료제를 환자에게 투여하는 것을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 치료제는 화학요법제 또는 제2 항체이다. 화학요법제는 예를 들어 겐시타빈, 파클리탁셀, 카르보플라틴 및 시스플라틴, 또는 파클리탁셀, 카르보플라틴 및 시스플라틴 중 2개 또는 3개 모두의 조합이다. 특정 실시양태에서, 제2 항체는 EGFR, HER2, HER3 또는 HER4에 결합하거나 또는 이들 표적 중 2개 이상에 결합한다. 특정 실시양태에서, 치료할 암은 비소세포 폐암, 유방암, 난소암, 두경부암, 자궁경부암, 방광암, 식도암, 전립선암 및/또는 결장직장암이다. 한 실시양태에서, 종양 재발까지의 시간의 증가는 항체의 부재 하의 재발까지의 시간보다 적어도 1.25배 더 크다. 한 실시양태에서, 종양 재발까지의 시간의 증가는 항체의 부재 하의 재발까지의 시간보다 적어도 1.50배 더 크다.

도면의 간단한 설명

- [0032] 도 1a. 그의 음용수 중 비히클 (수크로스) 또는 dox (2gm/L)를 임의로 투여한 확립된 Calu3-shNRG1 이종이식 종양을 갖는 마우스에 대한 종양 성장 곡선을 보여주는 그래프. 종양 부피는 연구 기간 동안 1주에 2회 측정하였다. 데이터는 자가-결정된 노트를 갖는 3차 스플라인으로서 그래프로 나타낸 종양 부피의 선형 혼합 효과 (LME) 모델 생성된 핏으로 제시된다.
- 도 1b. 화학요법제+수크로스 또는 화학요법제+dox로 처리된 확립된 Calu3-shNRG1 이종이식 종양을 갖는 마우스에 대한 종양 성장 곡선을 보여주는 그래프. 데이터는 자가-결정된 노트를 갖는 3차 스플라인으로서 그래프로 나타낸 종양 부피의 LME 모델 생성된 핏으로 제시된다.
- 도 2a. 수크로스 또는 dox (n=12/군)로 처리된 확립된 H441-shNRG1 이종이식 종양을 갖는 마우스에 대한 종양 성장 곡선을 보여주는 그래프. 데이터는 자가-결정된 노트를 갖는 3차 스플라인으로서 그래프로 나타낸 종양 부피의 LME 핏 분석으로 제시된다.
- 도 2b. 화학요법제 + 수크로스 또는 화학요법제 + dox (n=12/군)로 처리된 확립된 H441-shNRG1 이종이식 종양을 갖는 마우스에 대한 종양 성장 곡선을 보여주는 그래프. 데이터는 자가-결정된 노트를 갖는 3차 스플라인으로서 그래프로 나타낸 종양 부피의 LME 핏 분석으로 제시된다.

도 3a. 비히클 + 대조군 IgG (n=6), 시스플라틴 + 대조군 IgG (n=6), 또는 시스플라틴 + HER4ECD-Fc (n=8)로 처리된 LSL-K-ras^{G12D}; p53^{F1/+} 마우스에 대한 평균 종양 부피 +/- SEM을 보여주는 그래프. 돼지풀, 대조군 무린 IgG2a 항체.

도 3b. 95% 신뢰 구간을 갖는 치료 요법에 의한 종양 부담의 일일 변화 배수를 보여주는 그래프.

도 3c. 비히클 + 대조군 IgG (n=10), 시스플라틴 + 대조군 IgG (n=11), 시스플라틴 + HER4-ECD (n=8) 또는 비히클 + HER4-ECD (n=7)로 처리된 LSL-K-ras^{G12D}; p53^{F1/F1} 마우스에 대한 기준선으로부터의 종양 부담의 평균 변화 퍼센트 ± SEM을 보여주는 그래프.

도 4A. Kras-LSL-G12D 마우스 NSCLC 모델로부터의 나머지 종양 세포에서의 NRG1 mRNA 풍부화를 보여주는 그래프, 데이터는 하나의 마이크로어레이 프로브로부터 나타내고, 독립적 샘플에 대한 qPCR에 의해 검증된 바와 같다.

도 4B. qPCR에 의해 평가된 바와 같은 비히클 처리된 및 나머지 화학요법제-처리된 Calu3 종양 세포에서의 NRG1의 발현을 보여주는 그래프.

도 4C. qPCR에 의해 평가된 바와 같은 비히클 처리된 및 나머지 화학요법제-처리된 H441 종양 세포에서의 NRG1의 발현을 보여주는 그래프.

도 4D. qPCR에 의해 평가된 바와 같은 비히클 처리된 및 나머지 겐시타빈- 및 비노렐빈-처리된 Calu3 및 H441 종양 세포에서의 NRG1의 발현을 보여주는 그래프.

도 5. NRG1α (서열 3) 또는 NRG2β (서열 4)의 EGF 도메인의 정렬.

도 6. 항-NRG1 항체에 의한 HER3-Fc에 대한 125I-NRGβ1 결합의 억제를 보여주는 그래프.

도 7. 친화도 성숙 항-NRG1 항체 변이체에 의한 HER3-Fc에 대한 125I-NRGβ1 결합의 억제를 보여주는 그래프.

도 8. 비아코어(BIAcore)TM 검정에서 측정된 바와 같은 NRG1β에 대한 538.24 친화도 성숙 변이체 항-NRG1 IgG의 결합 친화도.

도 9. 비아코어TM 검정에서 측정된 바와 같은 NRG1α에 대한 538.24 친화도 성숙 변이체 항-NRG1 IgG의 결합 친화도.

도 10. 비아코어TM 검정에서 측정된 바와 같은 NRG1β 및 NRG1α에 대한 538.24.71 항-NRG1 항체의 결합 친화도.

도 11. 비아코어TM 검정에서 측정된 바와 같은 NRG1β 및 NRG1α에 대한 538.24.71 항-NRG1 항체의 결합 친화도.

도 12. 526.09 항체가 HRG1α 및 HRG1β 둘 다에 대한 결합에 대해 538.24.71 항체와 경쟁한다는 것을 보여주는 그래프.

도 13. 526.09 항-NRG1 항체의 친화도 성숙 변이체가 KIRA 검정에서 항-HER3 항체에 대한 NRG1α 및 NRG1β 결합을 차단하는 능력을 보여주는 표.

도 14. 526.90 친화도 성숙 변이체의 BV 시험의 결과를 보여주는 그래프.

도 15. 비아코어TM 검정에서 측정된 바와 같은 NRG1β 및 NRG1α에 대한 538.90.28 항-NRG1 항체의 결합 친화도.

도 16. 항-NRG1 항체 526.90.28 및 538.24.71이 KIRA를 이용하여 결정된 바와 같은 NRG1α 유도된 HER3 활성화를 차단하는 능력을 보여주는 그래프.

도 17. 항-NRG1 항체 526.90.28 및 538.24.71이 KIRA를 이용하여 결정된 바와 같은 NRG1β 유도된 HER3 활성화를 차단하는 능력을 보여주는 그래프.

도 18. 항-NRG1 항체가 인간 및 마우스 세포 둘 다에서 NRG1 자가분비 신호전달을 억제하는 능력을 보여주는 웨스턴 블롯.

도 19. 마우스 모델 시스템에서 HNSCC 종양 성장에 대한 항-NRG1 항체 +/- 화학요법제의 효과를 보여주는 그래

프.

도 20. 마우스 모델 시스템에서 폐암 종양 성장에 대한 항-NRG1 항체 +/- 화학요법제의 효과를 보여주는 종양 성장 곡선 및 상기 모델 시스템에서 무진행 생존을 보여주는 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 곡선.

도 21. 마우스 모델 시스템에서 NSCLC LKPH2 종양 성장에 대한 항-NRG1 항체 +/- 화학요법제의 효과를 보여주는 종양 성장 곡선 및 상기 모델 시스템에서 무진행 생존을 보여주는 카플란-마이어 곡선.

도 22. 마우스 모델 시스템에서 NSCLC H596 종양 성장에 대한 항-NRG1 항체 +/- 화학요법제의 효과를 보여주는 종양 성장 곡선.

도 23. 마우스 모델 시스템에서 NSCLC LKPH2 종양 성장에 대한 항-NRG1 항체 +/- 화학요법제의 효과를 보여주는 종양 성장 곡선 및 상기 모델 시스템에서 무진행 생존을 보여주는 카플란-마이어 곡선.

도 24. NRG1-HER3 신호전달에 의해 구동된 종양 성장 (a) 및 NRG1-HER4 신호전달에 의해 구동된 종양의 성장 (b)에 대한 항-NRG1 항체의 효과를 보여주는 종양 성장 곡선.

도 25. 항-NRG 항체의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열 (서열 20).

도 26. 항-NRG 항체의 경쇄 가변 영역 아미노산 서열 (각각 서열 22-27).

도 27. 항-NRG 항체의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열 (각각 서열 52, 54, 56, 58, 60, 62, 63, 64, 66, 68, 70).

도 28. 항-NRG 항체의 경쇄 가변 영역 아미노산 서열 (각각 서열 53, 55, 57, 59, 61, 53, 53, 65, 67, 69, 71).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033]

I. 정의

[0034]

본원의 목적을 위해 "수용자 인간 프레임워크"는 하기 정의되는 바와 같이 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크로부터 유래된 경쇄 가변 도메인 (VL) 프레임워크 또는 중쇄 가변 도메인 (VH) 프레임워크의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크이다. 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크"로부터 유래된" 수용자 인간 프레임워크는 그의 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 또는 아미노산 서열 변화를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 아미노산 변화의 수는 10개 이하, 9개 이하, 8개 이하, 7개 이하, 6개 이하, 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하, 또는 2개 이하이다. 일부 실시양태에서, VL 수용자 인간 프레임워크는 VL 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 서열 또는 인간 컨센서스 프레임워크 서열과 서열이 동일하다.

[0035]

"친화도"는 분자 (예를 들어, 항체)의 단일 결합 부위와 그의 결합 파트너 (예를 들어, 항원) 사이의 비공유 상호작용의 총합의 강도를 지칭한다. 달리 나타내지 않는 한, 본원에 사용된 "결합 친화도"는 결합 쌍의 구성원들 (예를 들어, 항체 및 항원) 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 내인성 결합 친화도를 지칭한다. 분자 X의 그의 파트너 Y에 대한 친화도는 일반적으로 해리 상수 (K_d)로 표시될 수 있다. 친화도는 본원에 기재된 방법을 포함하는 당업계에 공지된 통상의 방법으로 측정할 수 있다. 결합 친화도 측정을 위한 구체적인 예시적 및 대표적 실시양태를 하기 기재한다.

[0036]

"친화도 성숙" 항체는 항원에 대한 항체의 친화도를 개선시키는 변경을 갖지 않는 모 항체와 비교하여 하나 이상의 초가변 영역 (HVR)에서 하나 이상의 변경을 갖는 항체를 지칭한다.

[0037]

용어 "항-NRG1 항체" 및 "NRG1에 결합하는 항체"는 항체가 뉴레굴린1 (NRG1)을 표적화하는데 있어 진단제 및/또는 치료제로서 유용하도록 충분한 친화도로 NRG1에 결합할 수 있는 항체를 지칭한다. 한 실시양태에서, 관련되지 않은 비-NRG1 단백질에 대한 항-NRG1 항체의 결합의 정도는 예를 들어 방사성면역검정 (RIA)에 의해 측정된 바와 같이 NRG1에 대한 상기 항체의 결합의 약 10% 미만이다. 특정 실시양태에서, NRG1에 결합하는 항체는 $\leq 1 \mu M$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0.1 \text{ nM}$, $\leq 0.01 \text{ nM}$ 또는 $\leq 0.001 \text{ nM}$ (예를 들어, 10^{-8} M 이하, 예를 들어 10^{-8} M 내지 10^{-13} M , 예를 들어 10^{-9} M 내지 10^{-13} M)의 해리 상수 (K_d)를 갖는다. 특정 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 다른 종으로부터의 NRG1 사이에 보존된 NRG1의 에피토프에 결합한다.

[0038]

본원에서 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 다중특이적 항체 (예

를 들어, 이중특이적 항체), 및 원하는 항원-결합 활성을 나타내는 한 항체 단편을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 항체 구조를 포함한다.

[0039] "항체 단편"은 무손상 항체가 결합하는 항원에 결합하는 무손상 항체의 일부를 포함하는, 무손상 항체 이외의 분자를 지칭한다. 항체 단편의 예는 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; 디아바디; 선형 항체; 단일-쇄 항체 분자 (예를 들어, scFv); 및 항체 단편들로 형성된 다중특이적 항체를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0040] 참조 항체와 "동일한 에피토프에 결합하는 항체"는 경쟁 검정에서 참조 항체의 그의 항원에 대한 결합을 50% 이상 차단하고, 반대로 경쟁 검정에서 참조 항체가 항체의 그의 항원에 대한 결합을 50% 이상 차단하는 항체를 지칭한다. 예시적인 경쟁 검정이 본원에 제공된다.

[0041] 용어 "키메라" 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정한 공급원 또는 종으로부터 유래된 반면, 중쇄 및/또는 경쇄의 나머지가 다른 공급원 또는 종으로부터 유래된 항체를 지칭한다.

[0042] 용어 "암" 및 "암성"은 전형적으로 비조절된 세포 성장/증식을 특징으로 하는 포유동물의 생리학적 상태를 지칭하거나 기재한다. 암의 예는 암종, 림프종 (예를 들어, 호지킨 및 비-호지킨 림프종), 모세포종, 육종 및 백혈병을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 이러한 암의 보다 특정한 예는 편평세포암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 폐의 선암종 및 폐의 편평세포 암종, 복막암, 간세포성암, 위장암, 췌장암, 신경교종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간세포암, 유방암, 결장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 신장암, 간암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간 암종, 백혈병 및 다른 림프증식성 장애, 및 다양한 유형의 두경부암을 포함한다.

[0043] 항체의 "부류"는 그의 중쇄가 보유하는 불변 도메인 또는 불변 영역의 유형을 지칭한다. 5종의 주요 부류의 항체: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재하고, 이들 중 몇몇은 하위부류 (이소형), 예를 들어 IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ 및 IgA₂로 추가로 분류될 수 있다. 상이한 부류의 이뮤노글로불린에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α, δ, ε, γ 및 μ로 지칭된다.

[0044] 본원에 사용된 용어 "세포독성제"는 세포 기능의 억제 또는 저해 및/또는 세포 사멸 또는 파괴를 유발하는 물질을 지칭한다. 세포독성제는 방사성 동위원소 (예를 들어, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹², 및 Lu의 방사성 동위원소); 화학요법제 또는 약물 (예를 들어, 메토티렉세이트, 아드리아미신, 빈카 알칼로이드 (빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포시드), 독소루비신, 멜팔란, 미토마이신 C, 클로람부실, 다우노루비신 또는 다른 삽입제); 성장 억제제; 효소 및 그의 단편, 예컨대 핵산분해 효소; 항생제; 독소, 예컨대 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 소분자 독소 또는 효소 활성 독소 (그의 단편 및/또는 변이체 포함); 및 하기 개시되는 다양한 항종양제 또는 항암제를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0045] "이펙터 기능"은 항체 이소형에 따라 달라지는, 항체의 Fc 영역에 기인하는 생물학적 활성을 지칭한다. 항체 이펙터 기능의 예는 C1q 결합 및 보체 의존성 세포독성 (CDC); Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC); 식세포작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어, B 세포 수용체)의 하향 조절; 및 B 세포 활성화를 포함한다.

[0046] 작용제, 예를 들어 제약 제제의 "유효량"은 필요한 투여량에서 필요한 기간 동안 원하는 치료 또는 예방 결과를 달성하기에 유효한 양을 지칭한다.

[0047] 본원에서 용어 "Fc 영역"은 불변 영역의 적어도 일부를 함유하는 이뮤노글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하기 위해 사용된다. 상기 용어는 천연 서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 Cys226, 또는 Pro230으로부터 중쇄의 카르복실-말단으로 신장된다. 그러나, Fc 영역의 C-말단 리신 (Lys447)은 존재할 수 있거나 존재하지 않을 수 있다. 본원에서 달리 명시되지 않는 한, Fc 영역 또는 불변 영역 내의 아미노산 잔기의 넘버링은 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991]에 기재된 바와 같이 EU 인덱스로도 지칭되는 EU 넘버링 시스템에 따른다.

[0048] "프레임워크" 또는 "FR"은 초가변 영역 (HVR) 잔기 이외의 다른 가변 도메인 잔기를 지칭한다. 가변 도메인의 FR은 일반적으로 4개의 하기 FR 도메인으로 이루어진다: FR1, FR2, FR3 및 FR4. 따라서, HVR 및 FR 서열은 일반적으로 VH (또는 VL)에서 하기 순서로 나타난다: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

[0049] 용어 "전장 항체", "무손상 항체" 및 "전체 항체"는 본원에서 교환가능하게 사용되며, 천연 항체 구조와 실질적

으로 유사한 구조를 갖거나 또는 본원에서 정의된 바와 같은 Fc 영역을 함유하는 중쇄를 갖는 항체를 지칭한다.

[0050] 용어 "숙주 세포", "숙주 세포주" 및 "숙주 세포 배양물"은 교환가능하게 사용되고, 외인성 핵산이 도입된 세포 (이러한 세포의 자손 포함)를 지칭한다. 숙주 세포는 "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"를 포함하며, 이는 일차 형질전환된 세포 및 계대배양 횟수와 관계없이 그로부터 유래된 자손을 포함한다. 자손은 부모 세포와 핵산 함량이 완전히 동일하지 않을 수 있으나, 돌연변이를 함유할 수 있다. 본래 형질전환된 세포에 대해 스크리닝 또는 선택되는 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이체 자손이 본원에 포함된다.

[0051] "인간 항체"는 인간 또는 인간 세포에 의해 생산된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 보유하거나, 또는 인간 항체 레퍼토리 또는 다른 인간 항체-코딩 서열을 이용하여 비-인간 공급원으로부터 유래된 항체이다. 인간 항체의 이러한 정의에서 비-인간 항원-결합 잔기를 포함하는 인간화 항체는 명확하게 배제된다.

[0052] "인간 컨센서스 프레임워크"는 인간 이뮤노글로불린 VL 또는 VH 프레임워크 서열의 선택시에 가장 흔히 발생하는 아미노산 잔기를 나타내는 프레임워크이다. 일반적으로, 인간 이뮤노글로불린 VL 또는 VH 서열의 선택은 가변 도메인 서열의 하위군으로부터 행한다. 일반적으로, 서열의 하위군은 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3]에서와 같은 하위군이다. 한 실시양태에서, VL의 경우에 하위군은 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에서와 같은 하위군 카파 I이다. 한 실시양태에서, VH의 경우에 하위군은 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에서와 같은 하위군 III이다.

[0053] "인간화" 항체는 비-인간 HVR로부터의 아미노산 잔기 및 인간 FR로부터의 아미노산 잔기를 포함하는 키메라 항체를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 인간화 항체는 실질적으로 적어도 1개, 전형적으로 2개의 가변 도메인을 모두 포함할 것이며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 HVR (예를 들어, CDR)은 비-인간 항체의 것에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 항체의 것에 상응한다. 인간화 항체는 임의로 인간 항체로부터 유래된 항체 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 항체, 예를 들어 비-인간 항체의 "인간화 형태"는 인간화를 거친 항체를 지칭한다.

[0054] 본원에 사용된 용어 "초가변 영역" 또는 "HVR"은 서열이 초가변성이고/거나 구조적으로 한정된 루프 ("초가변 루프")를 형성하는 항체 가변 도메인의 각각의 영역을 지칭한다. 일반적으로, 천연 4-쇄 항체는 6개의 HVR; VH 내의 3개 (H1, H2, H3) 및 VL 내의 3개 (L1, L2, L3)를 포함한다. HVR은 일반적으로 초가변 루프로부터의 및/또는 "상보성 결정 영역" (CDR)으로부터의 아미노산 잔기를 포함하며, 후자는 서열 가변성이 가장 높고/거나 항원 인식과 관련된다. 예시적인 초가변 루프는 아미노산 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) 및 96-101 (H3)에서 발생한다. (문헌 [Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)].) 예시적인 CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3)은 L1의 아미노산 잔기 24-34, L2의 50-56, L3의 89-97, H1의 31-35B, H2의 50-65 및 H3의 95-102에서 발생한다. (문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)].) VH 내의 CDR1을 제외하고는, CDR은 일반적으로 초가변 루프를 형성하는 아미노산 잔기를 포함한다. CDR은 또한 항원에 접촉하는 잔기인 "특이성 결정 잔기" 또는 "SDR"을 포함한다. SDR은 단축-CDR, 또는 a-CDR로 지칭되는 CDR의 영역 내에 함유된다. 예시적인 a-CDR (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2 및 a-CDR-H3)은 L1의 아미노산 잔기 31-34, L2의 50-55, L3의 89-96, H1의 31-35B, H2의 50-58 및 H3의 95-102에서 발생한다. (문헌 [Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)] 참조.) 달리 나타내지 않는 한, HVR 잔기 및 가변 도메인에서의 다른 잔기 (예를 들어, FR 잔기)는 본원에서 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에 따라 넘버링된다.

[0055] "면역접합체"는 세포독성제를 포함하나 이에 제한되지는 않는 하나 이상의 이중 분자(들)에 접합된 항체이다.

[0056] "개체" 또는 "대상체" 또는 "환자"는 포유동물이다. 포유동물은 가축 (예를 들어, 소, 양, 고양이, 개 및 말), 영장류 (예를 들어, 인간 및 비-인간 영장류, 예컨대 원숭이), 토끼 및 설치류 (예를 들어, 마우스 및 래트)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 개체, 대상체 또는 환자는 인간이다.

[0057] "단리된" 항체는 그의 천연 환경의 성분에서 분리된 것이다. 일부 실시양태에서, 항체는 예를 들어 전기영동 (예를 들어, SDS-PAGE, 등전 포커싱 (IEF), 모세관 전기영동) 또는 크로마토그래피 (예를 들어, 이온 교환 또는 역상 HPLC)에 의해 결정된 바와 같이 95% 또는 99% 초과 순도로 정제한다. 항체 순도의 평가 방법의 검토를 위해, 예를 들어 문헌 [Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007)]을 참조한다.

[0058] "단리된" 핵산은 그의 천연 환경의 성분으로부터 분리된 핵산 분자를 지칭한다. 단리된 핵산은 핵산 분자를 통

상적으로 함유하는 세포에 함유되는 핵산 분자를 포함하지만, 핵산 분자는 염색체 외에 또는 그의 천연 염색체 위치와 상이한 염색체 위치에 존재한다.

[0059] "항-NRG1 항체를 코딩하는 단리된 핵산"은 항체 중쇄 및 경쇄 (또는 그의 단편)를 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 (단일 벡터 또는 개별 벡터 내의 이러한 분자(들) 및 숙주 세포에서 하나 이상의 위치에 존재하는 이러한 핵산 분자(들) 포함)를 지칭한다.

[0060] 본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하기 위해 사용되고, 즉 이러한 집단을 구성하는 개별 항체는 일반적으로 소량으로 존재할 수도 있는, 예를 들어 자연 발생 돌연변이를 포함하거나 모노클로날 항체 제제의 생산 동안 생성되는 가능한 변이체 항체를 제외하고는 동일 하고/하거나, 동일한 에피토프에 결합한다. 전형적으로 상이한 결정자 (에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체 를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 반대로, 모노클로날 항체 제제의 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정자에 대해 지시된다. 따라서, 수식어 "모노클로날"은 항체의 실질적으로 균질한 집단으로부터 얻은 항체의 특성을 나타내고, 임의의 특정한 방법에 의한 항체 생산을 필요로 하는 것으로서 간주되지 않아야 한다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 모노클로날 항체는 하이브리도마 방법, 재조합 DNA 방법, 파지-디스플레이 방법, 및 인간 이뮤노글로불린 로커스의 전부 또는 일부를 함유하는 트랜스제닉 동물을 이용하는 방법을 포함하 나 이에 제한되지는 않는 다양한 기술에 의해 제조할 수 있고, 이러한 방법 및 모노클로날 항체를 제조하기 위 한 다른 예시적인 방법이 본원에 기재된다.

[0061] "네이키드 항체"는 이중 모이어티 (예를 들어, 세포독성 모이어티) 또는 방사성표지에 접합되지 않은 항체를 지 칭한다. 네이키드 항체는 제약 제제에 존재할 수 있다.

[0062] "천연 항체"는 변화하는 구조를 갖는 자연 발생 이뮤노글로불린 분자를 지칭한다. 예를 들어, 천연 IgG 항체는 디설피드-결합된 2개의 동일한 경쇄 및 2개의 동일한 중쇄로 이루어진 약 150,000 달톤의 이중사량체 당단백질 이다. N-말단으로부터 C-말단으로, 각각의 중쇄는 가변 영역 (VH) (또한 가변 중쇄 도메인 또는 중쇄 가변 도 메인으로 지칭됨)에 이어 3개의 불변 도메인 (CH1, CH2 및 CH3)을 갖는다. 유사하게, N-말단으로부터 C-말단으 로, 각각의 경쇄는 가변 영역 (VL) (또한 가변 경쇄 도메인 또는 경쇄 가변 도메인으로 지칭됨)에 이어 불변 경 쇄 (CL) 도메인을 갖는다. 항체의 경쇄는 그의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기반으로, 카파 (κ) 및 람다 (λ)로 지칭되는 2가지 유형 중 하나로 할당될 수 있다.

[0063] 용어 "포장 삽입물"은 적응증, 용법, 투여량, 투여, 조합 요법, 금기사항, 및/또는 이러한 치료 제품의 사용에 대한 경고에 대한 정보를 함유하는, 치료 제품의 상업용 패키지에 통상적으로 포함되는 설명서를 지칭하기 위해 사용된다.

[0064] 참조 폴리펩티드 서열에 대한 "아미노산 서열 동일성 퍼센트(%)"는 서열을 정렬시키고 필요한 경우에는 최대 서 열 동일성 퍼센트 달성을 위해 갭을 도입한 후 임의의 보존적 치환을 서열 동일성의 일부로 간주하지 않으면서 참조 폴리펩티드 서열 내의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. 아 미노산 서열 동일성 퍼센트를 결정하기 위한 정렬은 당업계 기술 범위 내의 다양한 방법, 예를 들어 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 메갈린(Megalign) (DNASTAR) 소프트웨어를 이용하여 달성할 수 있다. 당업자는 비교할 전장 서열에 대한 최대 정렬을 달성하는데 필요한 임의의 알고리즘 을 포함하여 서열 정렬에 적절한 파라미터를 정할 수 있다. 그러나, 본원의 목적상, 아미노산 서열 동일성 % 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 이용하여 생성된다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제네텠크, 인크.(Genentech, Inc.) 소유로서, 소스 코드는 미국 저작권청 (20559 워싱턴 디.씨.)에 사용자 문서로 제 출되어 있고, 미국 저작권 등록 번호 TXU510087로 등록되어 있다. ALIGN-2 프로그램은 제네텠크, 인크. (캘리 포니아주 사우스 샌프란시스코)를 통해 공개적으로 이용가능하거나, 소스 코드로부터 컴파일링될 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 디지털 UNIX V4.0D를 포함하여 UNIX 운영 시스템에서 사용되도록 컴파일링되어야 한다. 모 든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되어 있으며 변하지 않는다.

[0065] ALIGN-2가 아미노산 서열 비교를 위해 사용되는 상황에서, 주어진 아미노산 서열 B에, 주어진 아미노산 서열 B 와, 또는 주어진 아미노산 서열 B에 대한 주어진 아미노산 서열 A의 아미노산 서열 동일성 % (대안적으로, 주어 진 아미노산 서열 B에, 주어진 아미노산 서열 B와, 또는 주어진 아미노산 서열 B에 대해 특정 아미노산 서열 동 일성 %를 갖거나 또는 이를 포함하는 주어진 아미노산 서열 A라는 어구로 기재될 수 있음)는 다음과 같이 계산 된다:

[0066] X/Y 의 분율 $\times 100$

- [0067] 여기서, X는 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의한 A 및 B의 프로그램 정렬시에 상기 프로그램에 의해 동일한 매치로 스코어링된 아미노산 잔기의 수이고, Y는 B의 아미노산 잔기의 전체 수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않은 경우에는 B에 대한 A의 아미노산 서열 동일성 %가 A에 대한 B의 아미노산 서열 동일성 %와 동일하지 않을 것임을 이해할 것이다. 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 아미노산 서열 동일성 % 값은 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 이용하여 상기 단락에 기재한 바와 같이 수득한다.
- [0068] 용어 "제약 제제"는 그 안에 함유된 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적일도록 하는 형태로 존재하며, 제제가 투여될 대상체에게 허용되지 않는 독성인 추가의 성분을 함유하지 않는 제제를 지칭한다.
- [0069] "제약상 허용되는 담체"는 대상체에게 비독성인, 활성 성분 이외의 다른 제약 제제 내의 성분을 지칭한다. 제약상 허용되는 담체는 완충제, 부형제, 안정화제 또는 보존제를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0070] 본원에 사용된 용어 "NRG"는 달리 나타내지 않는 한 포유동물, 예컨대 영장류 (예를 들어, 인간) 및 설치류 (예를 들어, 마우스 및 래트)를 포함하는, 임의의 척추동물 공급원으로부터의 임의의 천연 뉴레글린 (또한, 헤레글린으로 공지됨)을 지칭한다. 용어는 "전장" 비프로세싱된 NRG 뿐만 아니라 세포에서의 프로세싱으로부터 생성된 임의의 형태의 NRG를 포괄한다. 용어는 또한 NRG의 자연 발생 변이체, 예를 들어 스플라이스 변이체 또는 대립유전자 변이체를 포괄한다. 4가지 공지된 형태의 NRG가 존재한다: NRG1 (문헌 [Holmes, W.E. et al., Science 256:1205-1210 (1992)]); NRG2 (문헌 [Caraway, K.L. et al., Nature 387:512-516 (1997)]); NRG3 (문헌 [Zhang, E. et al., Proc Natl Acad Sci USA 94:9562-9567]); 및 NRG4 (문헌 [Harari, D. et al., Oncogene 18:2681-2689])). 대안적 스플라이싱으로 인해, 수용체 결합에 요구되는 NRG1 EGF-유사 도메인의 2가지 활성 이소형 (NRG1 α 와 (NRG1 α) 및 NRG1베타 (NRG β)로 지칭됨)이 존재한다. 예시적인 인간 NRG1의 서열은 진뱅크 등록 번호 BK000383에 제시된다 (문헌 [Falls, D. L., Ex Cell Res., 284:14-30 (2003)] 및 미국 특허 번호 5,367,060). 한 실시양태에서, NRG1 α 는 스위스 프룻 등록 번호 Q7RTV8의 아미노산 서열 (서열 1)을 포함한다. 한 실시양태에서, NRG1 α 의 EGF 도메인은 서열 1의 아미노산 S177-K241의 아미노산 서열 (서열 3)을 포함한다. 한 실시양태에서, NRG β 는 NCBI 등록 번호 NP_039250의 아미노산 서열 (서열 2)을 포함한다. 실시양태에서, NRG1 β 의 EGF 도메인은 서열 2의 아미노산 T176-K246의 아미노산 서열 (서열 4)을 포함한다.
- [0071] 본원에 사용된 "치료" (및 "치료하다" 또는 "치료하는"과 같은 그의 문법적 변형)는 치료되는 개체의 자연적 과정을 변경시키려는 임상적 개입을 지칭하고, 임상 병리상태의 예방을 위해 또는 그 과정 동안 수행될 수 있다. 바람직한 치료 효과는 질환의 발생 또는 재발 예방, 증상의 완화, 질환의 임의의 직접적 또는 간접적 병리학적 결과의 축소, 전이의 예방, 질환 진행 속도의 감소, 질환 상태의 개선 또는 완화, 및 완화 또는 개선된 예후를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-NRG1 항체는 질환의 발생을 지연시키거나, 질환의 진행을 지연시키거나, 재발을 예방하거나, 또는 종양 재발까지의 시간을 증가시키는데 사용된다. 특정 실시양태에서, 치료는 종양 재개시 세포의 수의 감소 또는 그의 완전한 부재; 종양 재개시 세포가 아닌 종양 내의 세포에 비해 고품종양에서 종양 재개시 세포의 수의 감소; 및/또는 종양 재개시 세포의 증식의 억제를 발생시킨다. 특정 실시양태에서, 항-NRG1 항체를 사용하는 치료는 종양 재발까지의 시간을 항-NRG1 항체를 사용하는 치료의 부재 하의 종양 재발까지의 시간보다 적어도 1.25, 1.50, 1.75, 2.0배 더 크게 증가시킨다.
- [0072] 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체의 항원에 대한 결합에 관여하는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 지칭한다. 천연 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인 (각각 VH 및 VL)은 일반적으로 유사한 구조를 갖고, 각각의 도메인은 4개의 보존된 프레임워크 영역 (FR) 및 3개의 초가변 영역 (HVR)을 포함한다. (예를 들어, 문헌 [Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)] 참조.) 단일 VH 또는 VL 도메인은 항원-결합 특이성을 부여하기에 충분할 수 있다. 또한, 특정한 항원에 결합하는 항체는 각각 상보성 VL 또는 VH 도메인의 라이브러리를 스크리닝하기 위해 항원에 결합하는 항체로부터의 VH 또는 VL 도메인을 사용하여 분리할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991)]을 참조한다.
- [0073] 본원에 사용된 용어 "백터"는 그 백터가 연결된 또 다른 핵산을 증식시킬 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 상기 용어는 자기-복제 핵산 구조로서의 백터 뿐만 아니라 백터가 그 내부로 도입된 숙주 세포의 계놈 내로 통합되는 백터를 포함한다. 특정 백터는 그 백터가 작동가능하게 연결된 핵산의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 백터는 본원에서 "발현 백터"로 지칭된다.

- [0074] II. 조성물 및 방법
- [0075] HER3 (ErbB3) 또는 HER4 (ErbB4) 수용체를 통해 일어날 수 있는 뉴레굴린 (NRG1) 신호전달은 PI3K/Akt, PKC, MAPK 및 Ras 신호전달 경로를 포함하는 다중 신호전달 캐스케이드를 촉발시킬 수 있다. 문헌 [Junttila, T. T., et al. (2009); Lee-Hoeflich et al., (2008)]; WO2011103242; 미국 특허 공개 번호 20110229493. 또한, NRG1 신호전달의 억제는 치료제를 사용하는 치료 후의 종양 재발생 또는 재발의 지연 또는 예방을 발생시킨다. 실시예 2 - 4 및 WO2011103242; 미국 특허 공개 번호 20110229493. NRG1 유도된 신호전달을 억제하는 항-NRG1 항체는 자가분비 NRG1 신호전달을 포함하여 NRG1 신호전달과 연관된 암의 치료에 유용하다.
- [0076] 따라서, 본 발명의 한 측면은 NRG1에 결합하는 항체 (항-NRG1 항체)를 제공한다. 이들 항체는 암의 치료 및 치료제를 사용하는 치료 후의 내성 및/또는 암의 재발의 예방에서의 용도를 발견한다.
- [0077] 한 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 뉴레굴린1 α 및 뉴레굴린1 β 이소형 둘 다에 결합한다. 한 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 뉴레굴린1 β 의 EGF 도메인 및 뉴레굴린1 α 의 EGF 도메인에 결합한다.
- [0078] 일부 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 뉴레굴린1 β 에 10 nM, 1 nM, 1×10^{-1} nM, 1×10^{-2} nM, 1×10^{-3} nM 또는 그 미만의 kD로 결합하고, 뉴레굴린1 α 에 10 nM, 1 nM, 1×10^{-1} nM, 1×10^{-2} nM, 1×10^{-3} nM 또는 그 미만의 kD로 결합한다.
- [0079] 일부 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 뉴레굴린1 β 의 EGF 도메인에 10 nM, 1 nM, 1×10^{-1} nM, 1×10^{-2} nM, 1×10^{-3} nM 또는 그 미만의 kD로 결합하고, 뉴레굴린1 α 의 EGF 도메인에 10 nM, 1 nM, 1×10^{-1} nM, 1×10^{-2} nM, 1×10^{-3} nM 또는 그 미만의 kD로 결합한다.
- [0080] 일부 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 뉴레굴린1 β 에 10 nM, 1 nM, 1×10^{-1} nM, 1×10^{-2} nM, 1×10^{-3} nM 또는 그 미만의 kD로 결합한다.
- [0081] 일부 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 뉴레굴린1 β 의 EGF 도메인에 10 nM, 1 nM, 1×10^{-1} nM, 1×10^{-2} nM, 1×10^{-3} nM 또는 그 미만의 kD로 결합한다.
- [0082] 일부 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 뉴레굴린1 α 에 결합하는 것과 동일하거나 이보다 큰 친화도로 뉴레굴린1 β 에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 뉴레굴린1 α 에 결합하는 친화도보다 10-, 20-, 30-, 40-, 50-, 60-, 70-, 80-, 90-, 100-, 125-, 150-, 200-, 250-, 300-, 350-, 400-, 450-, 500-, 550-, 600-, 650-, 700-, 750-, 800-, 850-, 900-, 950-, 1000-, 1500-, 2000배 또는 그 초과로 더 큰 친화도로 뉴레굴린1 β 에 결합한다.
- [0083] 일부 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 뉴레굴린1 α 의 EGF 도메인에 결합하는 것과 동일하거나 이보다 큰 친화도로 뉴레굴린1 β 의 EGF 도메인에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 뉴레굴린1 α 의 EGF 도메인에 결합하는 친화도보다 10-, 20-, 30-, 40-, 50-, 60-, 70-, 80-, 90-, 100-, 125-, 150-, 200-, 250-, 300-, 350-, 400-, 450-, 500-, 550-, 600-, 650-, 700-, 750-, 800-, 850-, 900-, 950-, 1000-, 1500-, 2000배 또는 그 초과로 더 큰 친화도로 뉴레굴린1 β 의 EGF 도메인에 결합한다.
- [0084] 일부 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 뉴레굴린1 β 에 결합하는 것과 동일하거나 이보다 큰 친화도로 뉴레굴린1 α 에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 뉴레굴린1 β 에 결합하는 친화도보다 10-, 20-, 30-, 40-, 50-, 60-, 70-, 80-, 90-, 100-, 125-, 150-, 200-, 250-, 300-, 350-, 400-, 450-, 500-, 550-, 600-, 650-, 700-, 750-, 800-, 850-, 900-, 950-, 1000-, 1500-, 2000배 또는 그 초과로 더 큰 친화도로 뉴레굴린1 α 에 결합한다.
- [0085] 일부 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 뉴레굴린1 β 의 EGF 도메인에 결합하는 것과 동일하거나 이보다 큰 친화도로 뉴레굴린1 α 의 EGF 도메인에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 뉴레굴린1 β 의 EGF 도메인에 결합하는 친화도보다 10-, 20-, 30-, 40-, 50-, 60-, 70-, 80-, 90-, 100-, 125-, 150-, 200-, 250-, 300-, 350-, 400-, 450-, 500-, 550-, 600-, 650-, 700-, 750-, 800-, 850-, 900-, 950-, 1000-, 1500-, 2000배 또는 그 초과로 더 큰 친화도로 뉴레굴린1 α 의 EGF 도메인에 결합한다.
- [0086] 한 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 뉴레굴린1 β 의 에피토프 및 뉴레굴린1 α 의 에피토프에 결합한다. 한 실시양태에서, 에피토프는 뉴레굴린1 β 및 뉴레굴린1 α 의 EGF 도메인에 존재한다. 한 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 서열 4의 아미노산 서열로부터의, 그 내의 또는 그와 중첩되는 뉴레굴린1 β 의 에피토프에 결합한다. 한 실시양

태에서, 항-NRG1 항체에 의해 결합된 뉴레글린1 β 의 에피토프는 예를 들어 서열 4의 아미노산 1-37 또는 서열 4의 아미노산 38-64와 같은 서열 4의 아미노산 서열의 절편으로부터의 것, 그 내의 것 또는 그와 중첩되는 것이다.

[0087] 한 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 서열 3의 아미노산 서열로부터의, 그 내의 또는 그와 중첩되는 뉴레글린1 α 의 에피토프에 결합한다. 한 실시양태에서, 항-NRG1 항체에 의해 결합되는 뉴레글린1 α 의 에피토프는 예를 들어 서열 3의 아미노산 1-36 또는 서열 3의 아미노산 37-58의 아미노산 서열과 같은 서열 3의 아미노산 서열의 절편으로부터의 것, 그 내의 것 또는 그와 중첩되는 것이다.

[0088] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 제공된 항-NRG1 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항-NRG1 항체를 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 제공된 항-NRG1 항체와 동일한 에피토프에 대한 결합과 경쟁하는 항-NRG1 항체를 제공한다.

[0089] A. 예시적인 NRG 항체

[0090] 한 측면에서, 본 발명은 서열 5, 28, 34, 37, 39, 41 및 76으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, 서열 6 및 29로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2 및 서열 7, 30, 42, 43, 44, 48 및 50으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 항-NRG1 항체를 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 서열 8, 12, 16, 19 및 31로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, 서열 9, 13, 17, 32, 46 및 49로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2 및 서열 10, 11, 14, 15, 18, 20, 33, 35, 36, 38, 40, 45, 47 및 51로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항-NRG1 항체를 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 서열 5, 28, 34, 37, 39, 41 및 76으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, 서열 6 및 29로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2 및 서열 7, 30, 42, 43, 44, 48 및 50으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, 서열 8, 12, 16, 19 및 31로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, 서열 9, 13, 17, 32, 46 및 49로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2 및 서열 10, 11, 14, 15, 18, 20, 33, 35, 36, 38, 40, 45, 47 및 51로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항-NRG1 항체를 제공한다.

[0091] 한 측면에서, 본 발명은 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2 및 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 항-NRG1 항체를 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 서열 8, 12, 16 및 19로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, 서열 9, 13 및 17로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2 및 서열 10, 11, 14, 15, 18 및 20으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항-NRG1 항체를 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2 및 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, 서열 8, 12, 16 및 19로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, 서열 9, 13 및 17로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2 및 10, 11, 14, 15, 18 및 20으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3 서열을 포함하는 항-NRG1 항체를 제공한다.

[0092] 한 측면에서, 본 발명은 서열 28, 34, 37, 39, 41 및 76으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2 및 서열 30, 42, 43, 44, 48 및 50으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 항-NRG1 항체를 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 서열 19 및 31로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, 서열 32, 46 및 49로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2 및 33, 35, 36, 38, 40, 45, 47 및 51로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3 서열을 포함하는 항-NRG1 항체를 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 서열 28, 34, 37, 39, 41 및 76으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1 서열, 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2 및 서열 30, 42, 43, 44, 48 및 50으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, 서열 19 및 31로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, 서열 32, 46 및 49로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2 및 서열 33, 35, 36, 38, 40, 45, 47 및 51로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항-NRG1 항체를 제공한다.

[0093] 한 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 HVR을 포함하는 항-NRG1 항체를 제공한다.

[0094] 한 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 적어도 1개, 적어도 2개 또는 모

는 3개의 VH HVR 서열을 포함하는 항체를 제공한다. 추가 실시양태에서, 항체는 (a) 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함한다.

[0095] 한 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 적어도 1개, 적어도 2개 또는 모든 3개의 VL HVR 서열을 포함하는 항체를 제공한다. 한 실시양태에서, 항체는 (a) 서열 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다.

[0096] 또 다른 측면에서, 본 발명의 항체는 (a) (i) 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열 7로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 적어도 1개, 적어도 2개 또는 모든 3개의 VH HVR 서열을 포함하는 VH 도메인; 및 (b) (i) 서열 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (c) 서열 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 적어도 1개, 적어도 2개 또는 모든 3개의 VL HVR 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0097] 또 다른 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 18로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항체를 제공한다.

[0098] 한 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 76의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 29의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 43의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 31의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 33의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 HVR을 포함하는 항-NRG1 항체를 제공한다.

[0099] 한 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 76의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 29의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열 43의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 적어도 1개, 적어도 2개 또는 모든 3개의 VH HVR 서열을 포함하는 항체를 제공한다. 추가 실시양태에서, 항체는 (a) 서열 76의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 29의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열 43의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함한다.

[0100] 한 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 31의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 33의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 적어도 1개, 적어도 2개 또는 모든 3개의 VL HVR 서열을 포함하는 항체를 제공한다. 한 실시양태에서, 항체는 (a) 서열 31의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 33의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다.

[0101] 또 다른 측면에서, 본 발명의 항체는 (a) (i) 서열 76의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열 29의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열 43으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 적어도 1개, 적어도 2개 또는 모든 3개의 VH HVR 서열을 포함하는 VH 도메인; 및 (b) (i) 서열 31의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (c) 서열 33의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 적어도 1개, 적어도 2개 또는 모든 3개의 VL HVR 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0102] 또 다른 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 76의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 29의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 43의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 31의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 33으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항체를 제공한다.

[0103] 한 측면에서, 본 발명은 서열 21의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하는 항-NRG1 항체를 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 서열 22, 23, 24, 25, 26 및 27로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하는 항-NRG1 항체를 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 서열 21의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 22, 23, 24, 25, 26 및 27로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항-NRG1 항체를 제공한다.

- [0104] 한 측면에서, 본 발명은 서열 52, 54, 56, 58, 60, 62, 63, 64, 66, 68, 70 및 72로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하는 항-NRG1 항체를 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 서열 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73 및 75로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하는 항-NRG1 항체를 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 서열 52, 54, 56, 58, 60, 62, 63, 64, 66, 68, 70, 및 72 및 VL로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 서열 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73 및 75로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 VH를 포함하는 항-NRG1 항체를 제공한다.
- [0105] 또 다른 측면에서, 항-NRG1 항체는 서열 21의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 VH 서열을 포함한다. 또 다른 측면에서, 항-NRG1 항체는 서열 22, 23, 24, 25, 26 및 27로부터 선택된 아미노산에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 VL 서열을 포함한다. 또 다른 측면에서, 항-NRG1 항체는 서열 21의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 VH 서열 및 서열 22, 23, 24, 25, 26 및 27로부터 선택된 아미노산에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 VL 서열을 포함한다.
- [0106] 또 다른 측면에서, 항-NRG1 항체는 서열 52, 54, 56, 58, 60, 62, 63, 64, 66, 68, 70 및 72로부터 선택된 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 VH 서열을 포함한다. 또 다른 측면에서, 항-NRG1 항체는 서열 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73 및 75로부터 선택된 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 VL 서열을 포함한다. 또 다른 측면에서, 항-NRG1 항체는 서열 52, 54, 56, 58, 60, 62, 63, 64, 66, 68, 70 및 72로부터 선택된 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 VH 서열 및 서열 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73 및 75로부터 선택된 아미노산에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 VL 서열을 포함한다.
- [0107] 또 다른 측면에서, 항-NRG1 항체는 서열 21의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 VH 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 VH 서열은 참조 서열에 대해 치환 (예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하지만, 그 서열을 포함하는 항-NRG1 항체는 NRG1 α 및 NRG1 β 에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시양태에서, 총 1 내지 10개의 아미노산이 서열 21에서 치환, 삽입 및/또는 결실된다. 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR 외부의 영역에서 (즉, FR에서) 일어난다. 임의로, 항-NRG1 항체는 서열 21의 VH 서열을 포함한다 (그 서열의 번역후 변형 포함). 특정한 실시양태에서, VH는 (a) 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (c) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 HVR을 포함한다.
- [0108] 또 다른 측면에서, 서열 26의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인 (VL)을 포함하는 항-NRG1 항체가 제공된다. 특정 실시양태에서, 참조 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 VL 서열은 치환 (예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하지만, 그 서열을 포함하는 항-NRG1 항체는 NRG1 α 및 NRG1 β 에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시양태에서, 총 1 내지 10개의 아미노산이 서열 26에서 치환, 삽입 및/또는 결실된다. 특정 실시양태에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 HVR 외부의 영역에서 (즉, FR에서) 일어난다. 임의로, 항-NRG1 항체는 서열 26의 VL 서열을 포함한다 (그 서열의 번역후 변형 포함). 특정한 실시양태에서, VL은 (a) 서열 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 HVR을 포함한다.
- [0109] 또 다른 측면에서, 상기 제공된 임의의 실시양태에서와 같은 VH 및 상기 제공된 임의의 실시양태에서와 같은 VL을 포함하는 항-NRG1 항체가 제공된다. 한 실시양태에서, 항체는 각각 서열 21 및 서열 26의 VH 및 VL 서열을 포함한다 (이들 서열의 번역후 변형 포함).
- [0110] 또 다른 측면에서, 항-NRG1 항체는 서열 63의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 VH 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 VH 서열은 참조 서열에 대해 치환 (예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하지만, 그 서열을 포함하는 항-NRG1 항체는 NRG1 α 및 NRG1 β 에 결합

하는 능력을 보유한다. 특정 실시양태에서, 총 1 내지 10개의 아미노산이 서열 63에서 치환, 삽입 및/또는 결실된다. 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR 외부의 영역에서 (즉, FR에서) 일어난다. 임의로, 항-NRG1 항체는 서열 63의 VH 서열을 포함한다 (그 서열의 번역후 변형 포함). 특정한 실시양태에서, VH는 (a) 서열 76의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열 29의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (c) 서열 43의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 HVR을 포함한다.

[0111] 또 다른 측면에서, 서열 53의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인 (VL)을 포함하는 항-NRG1 항체가 제공된다. 특정 실시양태에서, 참조 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 VL 서열은 치환 (예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하지만, 그 서열을 포함하는 항-NRG1 항체는 NRG1 α 및 NRG1 β 에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시양태에서, 총 1 내지 10개의 아미노산이 서열 53에서 치환, 삽입 및/또는 결실된다. 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR 외부의 영역에서 (즉, FR에서) 일어난다. 임의로, 항-NRG1 항체는 서열 53의 VL 서열을 포함한다 (그 서열의 번역후 변형 포함). 특정한 실시양태에서, VL은 (a) 서열 31의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 33의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 HVR을 포함한다.

[0112] 또 다른 측면에서, 상기 제공된 임의의 실시양태에서와 같은 VH 및 상기 제공된 임의의 실시양태에서와 같은 VL을 포함하는 항-NRG1 항체가 제공된다. 한 실시양태에서, 항체는 각각 서열 63 및 서열 53의 VH 및 VL 서열을 포함한다 (이들 서열의 번역후 변형 포함).

[0113] 또 다른 측면에서, 항-NRG1 항체는 서열 72의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 참조 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 중쇄 서열은 치환 (예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하지만, 그 서열을 포함하는 항-NRG1 항체는 NRG1 α 및 NRG1 β 에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시양태에서, 총 1 내지 10개의 아미노산이 서열 72에서 치환, 삽입 및/또는 결실된다. 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR 외부의 영역에서 (즉, FR에서) 일어난다. 임의로, 항-NRG1 항체는 서열 72의 중쇄 서열을 포함한다 (그 서열의 번역후 변형 포함).

[0114] 또 다른 측면에서, 서열 73의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 경쇄를 포함하는 항-NRG1 항체가 제공된다. 특정 실시양태에서, 참조 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 경쇄 서열은 치환 (예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하지만, 그 서열을 포함하는 항-NRG1 항체는 NRG1 α 및 NRG1 β 에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시양태에서, 총 1 내지 10개의 아미노산이 서열 73에서 치환, 삽입 및/또는 결실된다. 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR 외부의 영역에서 (즉, FR에서) 일어난다. 임의로, 항-NRG1 항체는 서열 73의 경쇄 서열을 포함한다 (그 서열의 번역후 변형 포함).

[0115] 또 다른 측면에서, 상기 제공된 임의의 실시양태에서와 같은 중쇄 및 상기 제공된 임의의 실시양태에서와 같은 경쇄를 포함하는 항-NRG1 항체가 제공된다. 한 실시양태에서, 항체는 각각 서열 72 및 서열 73의 중쇄 및 경쇄 서열을 포함한다 (이들 서열의 번역후 변형 포함).

[0116] 또 다른 측면에서, 항-NRG1 항체는 서열 74의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 참조 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 중쇄 서열은 치환 (예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하지만, 그 서열을 포함하는 항-NRG1 항체는 NRG1 α 및 NRG1 β 에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시양태에서, 총 1 내지 10개의 아미노산이 서열 74에서 치환, 삽입 및/또는 결실된다. 특정 실시양태에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 HVR 외부의 영역에서 (즉, FR에서) 일어난다. 임의로, 항-NRG1 항체는 서열 74의 중쇄 서열을 포함한다 (그 서열의 번역후 변형 포함).

[0117] 또 다른 측면에서, 서열 75의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 경쇄를 포함하는 항-NRG1 항체가 제공된다. 특정 실시양태에서, 참조 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 경쇄 서열은 치환 (예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하지만, 그 서열을 포함하는 항-NRG1 항체는 NRG1 α 및 NRG1 β 에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시양태에서, 총 1 내지 10개의 아미노산이 서열 75에서 치환, 삽입 및/또는 결실된다. 특정 실시양태에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 HVR 외부의 영역에서 (즉, FR에서) 일어난다. 임의로, 항-NRG1 항체는 서열 75의 경쇄 서열을 포함한다 (그 서열의 번역후 변형 포함).

- [0118] 또 다른 측면에서, 상기 제공된 임의의 실시양태에서와 같은 중쇄 및 상기 제공된 임의의 실시양태에서와 같은 경쇄를 포함하는 항-NRG1 항체가 제공된다. 한 실시양태에서, 항체는 각각 서열 74 및 서열 75의 중쇄 및 경쇄 서열을 포함한다 (이들 서열의 번역후 변형 포함).
- [0119] 추가 측면에서, 본 발명은 본원에 제공된 항-NRG1 항체와 동일한 에피토프 또는 에피토프들에 결합하는 항체를 제공한다. 한 실시양태에서, (a) 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 18로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항-NRG1 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체가 제공된다.
- [0120] 한 실시양태에서, (a) 서열 76의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 29의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 43의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 31의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 33으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항-NRG1 항체와 동일한 에피토프 또는 에피토프들에 결합하는 항체가 제공된다.
- [0121] 한 실시양태에서, 서열 21의 VH 서열 및 서열 26의 VL 서열을 포함하는 항-NRG1 항체와 동일한 에피토프 또는 에피토프들에 결합하는 항체가 제공된다. 한 실시양태에서, 서열 63의 VH 서열 및 서열 53의 VL 서열을 포함하는 항-NRG1 항체와 동일한 에피토프 또는 에피토프들에 결합하는 항체가 제공된다.
- [0122] 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항-NRG1 항체와 동일한 에피토프 또는 에피토프들에 대한 결합과 경쟁하는 항체가 제공된다.
- [0123] 한 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 뉴레굴린1 β 의 에피토프 및 뉴레굴린1 α 의 에피토프에 결합한다. 한 실시양태에서, 에피토프는 뉴레굴린1 β 의 EGF 도메인 및 뉴레굴린1 α 에 존재한다. 한 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 서열 4의 아미노산 서열로부터의, 그 내의 또는 그와 중첩되는 뉴레굴린1 β 의 에피토프에 결합한다. 한 실시양태에서, 항-NRG1 항체에 의해 결합되는 뉴레굴린1 β 의 에피토프는 예를 들어 서열 4의 아미노산 1-37 또는 서열 4의 아미노산 38-64와 같은 서열 4의 아미노산 서열의 절편으로부터의 것, 그 내의 것 또는 그와 중첩되는 것이다.
- [0124] 한 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 서열 3의 아미노산 서열로부터의, 그 내의 또는 그와 중첩되는 뉴레굴린1 α 의 에피토프에 결합한다. 한 실시양태에서, 항-NRG1 항체에 의해 결합되는 뉴레굴린1 α 의 에피토프는 예를 들어 서열 3의 아미노산 1-36 또는 서열 3의 아미노산 37-58의 아미노산 서열과 같은 서열 3의 아미노산 서열의 절편으로부터의 것, 그 내의 것 또는 그와 중첩되는 것이다.
- [0125] 본 발명의 추가 측면에서, 임의의 상기 실시양태에 따른 항-NRG1 항체는 키메라, 인간화 또는 인간 항체를 포함하는 모노클로날 항체이다. 한 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 항체 단편, 예를 들어 Fv, Fab, Fab', scFv, 디아바디 또는 F(ab')₂ 단편이다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 전장 항체, 예를 들어 무손상 IgG1 항체, 또는 본원에 정의된 바와 같은 다른 항체 부류 또는 이소형이다.
- [0126] 추가 측면에서, 임의의 상기 실시양태에 따른 항-NRG1 항체는 하기 섹션 1-7에 기재된 바와 같은 임의의 특징을 단독으로 또는 조합하여 포함할 수 있다:
- [0127] **1) 항체 친화도**
- [0128] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0.1 \text{ nM}$, $\leq 0.01 \text{ nM}$ 또는 $\leq 0.001 \text{ nM}$ (예를 들어, 10^{-8} M 이하, 예를 들어 10^{-8} M 내지 10^{-13} M , 예를 들어 10^{-9} M 내지 10^{-13} M)의 해리 상수 (Kd)를 갖는다.
- [0129] 한 실시양태에서, Kd는 하기 검정에 기재된 바와 같이 관심 항체의 Fab 버전 및 그의 항원을 사용하여 수행된 방사성표지된 항원 결합 검정 (RIA)에 의해 측정된다. 항원에 대한 Fab의 용액 결합 친화도는 비표지 항원의 적정 시리즈의 존재 하에 Fab를 최소 농도의 (¹²⁵I)-표지된 항원과 평형화시킨 다음, 결합된 항원을 항-Fab 항체-코팅된 플레이트로 포획함으로써 측정된다 (예를 들어, 문헌 [Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)] 참조). 검정 조건을 확립하기 위해, 마이크로타이터(MICROTITER)® 멀티-웰 플레이트 (써모 사이언티픽(Thermo Scientific))를 50 mM 탄산나트륨 (pH 9.6) 중의 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 포획 항-Fab 항체 (카펠 랩스(Cappel Labs))로 밤새 코팅한 후, PBS 중의 2% (w/v) 소 혈청 알부민으로 2 내지 5시간 동안 실온 (대략 23°C)에서 차단하였다. 비-흡착 플레이트 (눈크(Nunc) #269620)에서는 100 pM 또는 26 pM [¹²⁵I]-항원을 관심 Fab의 연속

희석물과 혼합한다 (예를 들어, 문헌 [Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599 (1997)]의 항-VEGF 항체, Fab-12의 평가와 일치함). 이어서, 관심 Fab를 밤새 인큐베이션하지만; 평형에 도달하는 것을 확실하게 하기 위해 더 오랜 시간 (예를 들어, 약 65시간) 동안 계속 인큐베이션할 수 있다. 이후에, 혼합물을 포획 플레이트로 옮겨 실온에서 (예를 들어, 1시간 동안) 인큐베이션한다. 이어서, 용액을 제거하고, 플레이트를 PBS 중의 0.1% 폴리소르베이트 20 (트윈(TWEEN)-20®)으로 8회 세척하였다. 플레이트를 건조시킬 때, 150 μ l/웰의 섬광제 (마이크로신트(MICROSCINT)-20™; 팩커드(Packard))를 첨가하고, 플레이트를 탑카운트(TOPCOUNT)™ 감마 계수기 (팩커드)로 10분 동안 계수한다. 최대 결합의 20% 이하를 제공하는 각 Fab의 농도를 선택하여 경쟁 결합 검정에 사용한다.

[0130] 또 다른 실시양태에 따르면, Kd는 예를 들어 ~10 반응 단위 (RU)로 고정화된 항원 CM5 칩을 사용하여 25℃에서 비아코어(BIACORE)®-2000 또는 비아코어®-3000 (비아코어, 인크.(BIAcore, Inc.), 뉴저지주 피스카타웨이)을 사용하는 표면 플라즈몬 공명 검정을 사용하여 측정된다. 간략하게, 카르복시메틸화 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, 비아코어, 인크.)을 공급업체의 지침에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDC) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS)로 활성화시킨다. 항원을 10 mM 아세트산나트륨 (pH 4.8)을 사용하여 5 μ g/ml (~0.2 μ M)로 희석한 후에 커플링된 단백질 대략 10 반응 단위 (RU)가 달성되도록 5 μ l/분의 유량으로 주사한다. 항원 주사 후, 미반응 기를 차단하기 위해 1 M 에탄올아민을 주입한다. 동역학적 측정을 위해, Fab의 2배 연속 희석물 (0.78 nM 내지 500 nM)을 대략 25 μ l/분의 유량으로 25℃에서 0.05% 폴리소르베이트 20 (트윈-20™) 계면활성제를 갖는 PBS (PBST) 내에 주사한다. 간단한 일-대-일 랭뮤어(Langmuir) 결합 모델 (비아코어® 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 이용하여 회합 및 해리 센서그램을 동시에 피팅시켜 회합률 (k_{on}) 및 해리율 (k_{off})을 계산한다. 평형 해리 상수 (Kd)는 k_{off}/k_{on} 의 비로 계산한다. 예를 들어, 문헌 [Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)]을 참조한다. 상기 표면-플라즈몬 공명 검정에 의한 회합률이 $10^6 M^{-1} s^{-1}$ 을 초과하는 경우, 회합률은 분광측정계, 예컨대 정지-유동 설치 분광광도계 (아비브 인스트루먼트(Aviv Instruments)) 또는 교반 큐벳이 장착된 8000-시리즈 SLM-아민코(SLM-AMINCO)™ 분광광도계 (써모스펙트로닉(ThermoSpectronic))에서 측정할 때 증가하는 농도의 항원의 존재 하에 PBS (pH 7.2) 중 20 nM의 항-항원 항체 (Fab 형태)의 25℃에서의 형광 방출 강도 (여기 = 295 nm, 방출 = 340 nm, 16 nm 대역-통과)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 쉐칭 기술을 이용하여 결정할 수 있다.

[0131] 2) 항체 단편

[0132] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 항체 단편이다. 항체 단편은 Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv 및 scFv 단편, 및 하기 기재된 다른 단편을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정 항체 단편의 검토를 위해, 문헌 [Hudson et al. Nat. Med. 9:129-134 (2003)]을 참조한다. scFv 단편의 검토를 위해, 예를 들어, 문헌 [Pluckthuen, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994)]을 참조하고; 또한 WO 93/16185; 및 미국 특허 번호 5,571,894 및 5,587,458을 참조한다. 셀비지 수용체 결합 에피토프 잔기를 포함하고 증가된 생체내 반감기를 갖는 Fab 및 F(ab')₂ 단편의 논의에 대해, 미국 특허 번호 5,869,046을 참조한다.

[0133] 디아바디는 2가 또는 이중특이적일 수 있는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 항체 단편이다. 예를 들어, EP 404,097; WO 1993/01161; 문헌 [Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003); 및 Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)]을 참조한다. 트리아바디 및 테트라바디는 또한 문헌 [Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)]에 기재되어 있다.

[0134] 단일-도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부 또는 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부를 포함하는 항체 단편이다. 특정 실시양태에서, 단일-도메인 항체는 인간 단일-도메인 항체이다 (도만티스, 인크.(Domantis, Inc.)), 매사추세츠주 월섬; 예를 들어 미국 특허 번호 6,248,516 B1 참조).

[0135] 항체 단편은 본원에 기재된 바와 같은 무손상 항체의 단백질분해적 소화 뿐만 아니라 재조합 숙주 세포 (예를 들어, 이. 콜라이(E. coli) 또는 파지)에 의한 생산을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 기술에 의해 제조될 수 있다.

[0136] 3) 키메라 및 인간화 항체

[0137] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 키메라 항체이다. 특정 키메라 항체는 예를 들어 미국 특허 번호 4,816,567; 및 문헌 [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)]에 기재되어 있다.

한 예에서, 키메라 항체는 비-인간 가변 영역 (예를 들어, 마우스, 래트, 햄스터, 토끼 또는 비-인간 영장류, 예컨대 원숭이로부터 유래된 가변 영역) 및 인간 불변 영역을 포함한다. 추가의 예에서, 키메라 항체는 부류 또는 하위부류가 부모 항체의 것으로부터 변화된 "부류 스위칭" 항체이다. 키메라 항체는 그의 항원-결합 단편을 포함한다.

[0138] 특정 실시양태에서, 키메라 항체는 인간화 항체이다. 전형적으로, 비-인간 항체는 부모 비-인간 항체의 특이성 및 친화도를 유지하면서 인간에 대한 면역원성이 감소하도록 인간화된다. 일반적으로, 인간화 항체는 HVR, 예를 들어 CDR (또는 그의 일부)이 비-인간 항체로부터 유래되고, FR (또는 그의 일부)이 인간 항체 서열로부터 유래된 1개 이상의 가변 도메인을 포함한다. 인간화 항체는 또한 임의로 인간 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 것이다. 일부 실시양태에서, 인간화 항체의 일부 FR 잔기는, 예를 들어 항체 특이성 또는 친화도를 복원하거나 또는 향상시키기 위해, 비-인간 항체 (예를 들어, HVR 잔기가 유래된 항체)로부터의 상응하는 잔기로 치환된다.

[0139] 인간화 항체 및 그의 제조 방법은 예를 들어 문헌 [Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)]에서 검토되었고, 예를 들어 문헌 [Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); Queen et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989)]; 미국 특허 번호 5,821,337, 7,527,791, 6,982,321, 및 7,087,409; [Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005)] (SDR (a-CDR) 그래프팅 기재); [Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991)] ("리서페이싱" 기재); [Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60 (2005)] ("FR 서플링" 기재); 및 [Osborn et al., Methods 36:61-68 (2005) 및 Klimka et al., Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000)] (FR 서플링에 대한 "가이드 선택" 접근법 기재)에 추가로 기재되어 있다.

[0140] 인간화에 사용될 수 있는 인간 프레임워크 영역은 "최적-적합" 방법을 사용하여 선택된 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Sims et al. J. Immunol. 151:2296 (1993)] 참조); 경쇄 또는 중쇄 가변 영역의 특정한 하위군의 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Carter et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); 및 Presta et al. J. Immunol., 151:2623 (1993)] 참조); 인간 성숙 (체세포 성숙) 프레임워크 영역 또는 인간 배선 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)] 참조); 및 FR 라이브러리 스크리닝으로부터 유래된 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Baca et al., J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997) 및 Rosok et al., J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996)] 참조)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0141] 4) 인간 항체

[0142] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 인간 항체이다. 인간 항체는 다양한 당업계의 공지된 기술을 이용하여 생성될 수 있다. 인간 항체는 일반적으로 문헌 [van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5:368-74 (2001) 및 Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008)]에 기재되어 있다.

[0143] 인간 항체는 항원 접종에 반응하여 인간 가변 영역을 갖는 무손상 인간 항체 또는 무손상 항체를 생산하도록 변형된 트랜스제닉 동물에게 면역원을 투여하여 제조할 수 있다. 이러한 동물은 전형적으로 내인성 이뮤노글로불린 로커스를 대체하거나 또는 염색체외에 존재하거나 동물의 염색체로 무작위적으로 통합된 인간 이뮤노글로불린 로커스의 전부 또는 일부를 함유한다. 이러한 트랜스제닉 마우스에서, 내인성 이뮤노글로불린 로커스는 일반적으로 불활성화된다. 트랜스제닉 동물로부터 인간 항체를 수득하는 방법의 검토를 위해, 문헌 [Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125 (2005)]을 참조한다. 또한, 예를 들어 미국 특허 번호 6,075,181 및 6,150,584 (제노마우스(XENOMOUSE)TM 기술 기재); 미국 특허 번호 5,770,429 (HuMab[®] 기술 기재); 미국 특허 번호 7,041,870 (K-M 마우스(K-M MOUSE)[®] 기술 기재), 및 미국 특허 출원 공개 번호 US 2007/0061900 (벨로시마우스(VelociMouse)[®] 기술 기재)을 참조한다. 이러한 동물에 의해 생성된 무손상 항체로부터의 인간 가변 영역은 예를 들어 상이한 인간 불변 영역과 조합시켜 추가로 변형될 수 있다.

[0144] 인간 항체는 또한 하이브리도마-기반 방법에 의해 제조될 수 있다. 인간 모노클로날 항체의 생산을 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주가 기재되어 있다. (예를 들어, 문헌 [Kozbor J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 및 Boerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991)] 참조.) 또한, 인간 B-세포 하이브리도마 기술을 통해 생성된 인간 항체가 문헌 [Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006)]에 기재되어 있다. 추가의 방법은, 예를 들어 미국 특허 번호 7,189,826 (하이브리도마 세포주로부터의 모노클로날 인간 IgM 항체 생산 기재) 및 문헌 [Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006)] (인간-인간 하이브리도마 기재)에 기재된 것을 포함한다. 인간 하이브리도마 기술 (트리오마(Trioma)

기술)은 또한 문헌 [Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937 (2005) 및 Vollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91 (2005)]에 기재되어 있다.

[0145] 인간 항체는 또한 인간-유래 파지 디스플레이 라이브러리로부터 선택된 Fv 클론 가변 도메인 서열을 단리하여 생성될 수 있다. 이어서, 이러한 가변 도메인 서열은 바람직한 인간 불변 도메인과 조합될 수 있다. 항체 라이브러리로부터 인간 항체를 선택하기 위한 기술은 하기 기재된다.

[0146] 5) 라이브러리-유래 항체

[0147] 본 발명의 항체는 원하는 활성을 갖는 항체에 대해 조합 라이브러리를 스크리닝하여 단리될 수 있다. 예를 들어, 파지 디스플레이 라이브러리를 생성하고, 원하는 결합 특성을 갖는 항체에 대하여 이러한 라이브러리를 스크리닝하는 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있다. 이러한 방법은 예를 들어 문헌 [Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001)]에서 검토되고, 예를 들어 문헌 [McCafferty et al., Nature 348:552-554; Clackson et al., Nature 352: 624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, in Methods in Molecular Biology 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004); 및 Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132(2004)]에 추가로 기재되어 있다.

[0148] 특정 파지 디스플레이 방법에서, VH 및 VL 유전자의 레퍼토리는 개별적으로 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)에 의해 클로닝되고, 파지 라이브러리에 무작위적으로 제조되며, 이는 이어서 문헌 [Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)]에 기재된 바와 같이 항원-결합 파지에 대해 스크리닝될 수 있다. 파지는 전형적으로 항체 단편을 단일-쇄 Fv (scFv) 단편 또는 Fab 단편으로 디스플레이한다. 면역화된 공급원으로부터의 라이브러리는 하이브리도마를 구축할 필요 없이 면역원에 대한 고-친화도 항체를 제공한다. 대안적으로, 나이브 레퍼토리를 클로닝 (예를 들어, 인간으로부터)하여, 문헌 [Griffiths et al., EMBO J, 12: 725-734 (1993)]에 기재된 바와 같이 어떠한 면역화도 없이 광범위한 비-자기 및 또한 자기 항원에 대한 항체의 단일 공급원을 제공할 수 있다. 최종적으로, 문헌 [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)]에 기재된 바와 같이, 줄기 세포로부터의 재배열되지 않은 V-유전자 절편을 클로닝하고, 고도로 가변성인 CDR3 영역을 코딩하고 시험관내 재배열이 달성되도록 무작위 서열을 함유하는 PCR 프라이머를 사용함으로써, 나이브 라이브러리를 또한 합성적으로 제조할 수 있다. 인간 항체 파지 라이브러리를 기재하고 있는 특허 공보는 예를 들어 미국 특허 번호 5,750,373, 및 미국 특허 공개 번호 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 및 2009/0002360을 포함한다.

[0149] 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체 또는 항체 단편은 본원에서 인간 항체 또는 인간 항체 단편으로 여겨진다.

[0150] 6) 다중특이적 항체

[0151] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 다중특이적 항체, 예를 들어 이중특이적 항체이다. 다중특이적 항체는 2개 이상의 상이한 부위에 대해 결합 특이성을 갖는 모노클로날 항체이다. 특정 실시양태에서, 결합 특이성 중 하나는 NRG1에 대한 것이고, 다른 하나는 임의의 다른 항원에 대한 것이다. 특정 실시양태에서, 이중특이적 항체는 NRG1의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 이중특이적 항체는 또한 NRG1을 발현하는 세포에 세포독성제를 국재화시키는데 사용될 수 있다. 이중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편으로서 제조될 수 있다.

[0152] 다중특이적 항체를 제조하기 위한 기술은 상이한 특이성을 갖는 2개의 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 재조합 공-발현 (문헌 [Milstein and Cuello, Nature 305: 537 (1983)]), WO 93/08829, 및 [Traunecker et al., EMBO J. 10: 3655 (1991)] 참조), 및 "노브-인-홀(knob-in-hole)" 조작 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,731,168 참조)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 다중특이적 항체는 또한 항체 Fc-이종이량체 분자를 제조하기 위한 정전기 스테어링 효과의 조작 (WO 2009/089004A1); 2개 이상의 항체 또는 단편의 가교 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,676,980, 및 문헌 [Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)] 참조); 이중특이적 항체를 생산하기 위한 류신 지퍼의 사용 (예를 들어, 문헌 [Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)] 참조); 이중특이적 항체 단편의 제조를 위한 "디아바디" 기술의 사용 (예를 들어, 문헌 [Hollinger et al., Proc. Nat'l

Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)] 참조); 및 단일-쇄 Fv (sFv) 이량체의 사용 (예를 들어, 문헌 [Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)] 참조); 및 예를 들어 문헌 [Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991)]에 기재된 바와 같은 삼중특이적 항체의 제조에 의해 제조될 수 있다.

[0153] "옥토퍼스 항체"를 포함하여, 3개 이상의 기능적 항원 결합 부위를 갖는 조작된 항체가 또한 본원에 포함된다 (예를 들어, US 2006/0025576A1 참조).

[0154] 본원의 항체 또는 단편은 또한 NRG1 뿐만 아니라 또 다른 상이한 항원에 결합하는 항원 결합 부위를 포함하는 "이중 작용 FAb" 또는 "DAF"를 포함한다 (예를 들어, US 2008/0069820 참조).

[0155] 7) 항체 변이체

[0156] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체의 아미노산 서열 변이체가 고려된다. 예를 들어, 항체의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선하는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체는 항체를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 적절한 변경을 도입하거나 펩티드 합성에 의해 제조할 수 있다. 이러한 변형은 예를 들어 항체의 아미노산 서열 내 잔기의 결실 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 최종 구조물이 원하는 특성, 예를 들어 항원-결합을 보유하도록, 최종 구조물에 도달하기 위해 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합이 이루어질 수 있다.

[0157] a. 치환, 삽입 및 결실 변이체

[0158] 특정 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 항체 변이체가 제공된다. 치환 돌연변이유발을 위한 관심 부위는 HVR 및 FR을 포함한다. 보존적 치환은 "보존적 치환"의 표제 하에 표 1에 제시된다. 보다 더 실질적인 변화는 "예시적인 치환"의 표제 하의 표 1에 아미노산 측쇄 부류에 관하여 하기 추가로 기재된 바와 같이 제공된다. 아미노산 치환은 관심 항체에 도입되고, 생성물은 원하는 활성, 예를 들어 유지/개선된 항원 결합, 감소된 면역원성 또는 개선된 ADCC 또는 CDC에 대해 스크리닝될 수 있다.

표 1

본래 잔기	예시적인 치환	바람직한 치환
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 노르류신	Leu
Leu (L)	노르류신; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 노르류신	Leu

[0159]

- [0160] 아미노산은 공통적인 측쇄 특성에 따라 분류될 수 있다:
- [0161] (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- [0162] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- [0163] (3) 산성: Asp, Glu;
- [0164] (4) 염기성: His, Lys, Arg;
- [0165] (5) 쇠 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro;
- [0166] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.
- [0167] 비-보존적 치환은 이들 부류 중의 하나의 구성원을 또 다른 부류로 교환하는 것을 수반할 것이다.
- [0168] 치환 변이체의 한 가지 유형은 부모 항체 (예를 들어, 인간화 또는 인간 항체)의 1개 이상의 추가변 영역 잔기를 치환하는 것을 포함한다. 일반적으로, 추가 연구를 위해 선택된 생성된 변이체(들)는 부모 항체에 비해 특정 생물학적 특성 (예를 들어, 상승된 친화도, 감소된 면역원성)의 변형 (예를 들어, 개선)을 가질 것이고/거나 부모 항체의 특정 생물학적 특성을 실질적으로 유지할 것이다. 예시적인 치환 변이체는 예를 들어 본원에 기재된 것과 같은 파지 디스플레이-기반 친화도 성숙 기술을 이용하여 편리하게 생성될 수 있는 친화도 성숙 항체이다. 간략하게, 1개 이상의 HVR 잔기가 돌연변이화되고, 변이체 항체가 파지 상에 디스플레이되고, 특정한 생물학적 활성 (예를 들어, 결합 친화도)에 대해 스크리닝된다.
- [0169] 변경 (예를 들어, 치환)은 예를 들어 항체 친화도를 개선하기 위해 HVR에서 이루어질 수 있다. 이러한 변경은 HVR "핫스팟", 즉 체세포 성숙 과정 (예를 들어, 문헌 [Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008) 참조], 및/또는 SDR (a-CDR) 동안 결합 친화도에 대해 시험된 생성된 변이체 VH 또는 VL로 높은 빈도에서 돌연변이화를 수행하는 코돈에 의해 코딩되는 잔기에서 이루어질 수 있다. 이차 라이브러리로부터의 구축 및 재선택에 의한 친화도 성숙은 예를 들어 문헌 [Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001))]에 기재되어 있다. 친화도 성숙의 일부 실시양태에서, 다양성은 임의의 다양한 방법 (예를 들어, 오류-유발 PCR, 쇠 서폴링, 또는 올리고뉴클레오타이드-지정된 돌연변이유발)에 의한 성숙을 위해 선택된 가변 유전자로 도입된다. 이어서, 이차 라이브러리를 생성한다. 이어서, 원하는 친화도를 갖는 임의의 항체 변이체를 확인하게 위해 라이브러리를 스크리닝한다. 다양성을 도입하는 다른 방법은 HVR-유도된 접근법과 연관되며, 여기서 여러 HVR 잔기 (예를 들어, 한 번에 4-6개 잔기)가 랜덤화된다. 항원 결합과 연관된 HVR 잔기는 예를 들어 알려진 스캐닝 돌연변이유발 또는 모델링을 이용하여 구체적으로 확인될 수 있다. 특히, CDR-H3 및 CDR-L3이 종종 표적화된다.
- [0170] 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 이러한 변경이 항원에 결합하는 항체의 능력을 실질적으로 감소시키지 않는 한, 하나 이상의 HVR 내에서 일어날 수 있다. 예를 들어, 결합 친화도를 실질적으로 감소시키지 않는 보존적 변경 (예를 들어, 본원에 제공된 바와 같은 보존적 치환)이 HVR에서 이루어질 수 있다. 이러한 변경은 HVR "핫스팟" 또는 SDR의 외부일 수 있다. 상기에서 제공된 변이체 VH 및 VL 서열의 특정 실시양태에서, 각각의 HVR은 변경되지 않거나, 또는 1, 2 또는 3개 이하의 아미노산 치환을 함유한다.
- [0171] 문헌 [Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085]에 기재된 바와 같이, 돌연변이유발을 위해 표적화될 수 있는 항체의 잔기 또는 영역의 확인에 유용한 방법은 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발"이라고 지칭된다. 이 방법에서, 잔기 또는 표적 잔기들의 군이 확인되고 (예를 들어, 하전된 잔기, 예컨대 arg, asp, his, lys 및 glu), 중성 또는 음으로 하전된 아미노산 (예를 들어, 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체되어 항체와 항원과의 상호작용에 영향을 미치는지의 여부를 결정한다. 추가의 치환은 초기 치환에 대한 기능적 감수성을 입증하는 아미노산 위치에 도입될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 항체와 항원 사이의 접촉점을 확인하기 위해 항원-항체 복합체의 결정 구조를 분석하는 것이 유익할 수 있다. 이러한 접촉 잔기 및 이웃하는 잔기는 치환을 위한 후보로 표적화되거나 또는 제거될 수 있다. 변이체는 그들이 원하는 특성을 함유하는지의 여부를 결정하기 위해 스크리닝될 수 있다.
- [0172] 아미노산 서열 삽입은 길이 범위가 1개의 잔기 내지 100개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드에 이르는 아미노 - 및/또는 카르복실-말단 융합, 뿐만 아니라 단일 또는 다수 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체를 포함한다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체는 효소 (예를

들어, ADEPT의 경우) 또는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드가 상기 항체의 N- 또는 C-말단에 융합된 것을 포함한다.

[0173] **b. 글리코실화 변이체**

[0174] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 항체가 글리코실화되는 정도를 증가시키거나 감소시키도록 변경된다. 항체에 대한 글리코실화 부위의 부가 또는 결실은 하나 이상의 글리코실화 부위가 생성되거나 제거되도록 아미노산 서열을 변경함으로써 편리하게 달성될 수 있다.

[0175] 항체가 Fc 영역을 포함하는 경우, 이에 부착된 탄수화물이 변경될 수 있다. 포유동물 세포에 의해 생산된 천연 항체는 전형적으로 Fc 영역의 CH2 도메인의 Asn297에의 N-연결에 의해 일반적으로 부착되는 분지형 이중안테나 올리고사카라이드를 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Wright et al. TIBTECH 15:26-32 (1997)]을 참조한다. 올리고사카라이드는 다양한 탄수화물, 예를 들어 만노스, N-아세틸 글루코사민 (GlcNAc), 갈락토스 및 시알산 뿐만 아니라 이중안테나 올리고사카라이드 구조의 "줄기" 내의 GlcNAc에 부착된 푸코스를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 내의 올리고사카라이드의 변형은 특정 개선된 특성을 갖는 항체 변이체를 제조하기 위해 이루어질 수 있다.

[0176] 한 실시양태에서, Fc 영역에 (직접 또는 간접적으로) 부착된 푸코스가 결핍된 탄수화물 구조를 갖는 항체 변이체가 제공된다. 예를 들어, 이러한 항체에서 푸코스의 양은 1% 내지 80%, 1% 내지 65%, 5% 내지 65% 또는 20% 내지 40%일 수 있다. 푸코스의 양은 예를 들어 WO 2008/077546에 기재된 바와 같이 MALDI-TOF 질량 분광측정법에 의해 측정된 Asn 297에 부착된 모든 당구조물 (예를 들어, 복합체, 하이브리드 및 고만노스 구조물)의 합에 비해 Asn297에서 당 쇄 내의 푸코스의 평균적인 양을 계산하여 결정된다. Asn297은 Fc 영역의 약 위치 297 (Fc 영역 잔기의 Eu 넘버링)에 위치한 아스파라긴 잔기를 나타내지만; Asn297은 또한 항체의 부가적 서열 변이에 의해 위치 297의 약 ± 3 아미노산 상류 또는 하류, 즉 위치 294와 300 사이에 위치할 수 있다. 이러한 푸코실화 변이체는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 공개 번호 US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (교와 핫코 고교 캅파니 리미티드(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd))을 참조한다. "탈푸코실화" 또는 "푸코스-결핍" 항체 변이체에 대한 문헌의 예는 하기를 포함한다: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; 문헌 [Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)]. 탈푸코실화 항체를 생산할 수 있는 세포주의 예는 단백질 푸코실화가 결핍된 Lec13 CHO 세포 (문헌 [Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)]); 미국 특허 출원 번호 US 2003/0157108 A1 (Presta, L); 및 WO 2004/056312 A1 (Adams et al., 특히 실시예 11)), 및 녹아웃 세포주, 예컨대 알파-1,6-푸코실트랜스퍼라제 유전자, FUT8, 녹아웃 CHO 세포 (예를 들어, 문헌 [Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006)]; 및 WO2003/085107 참조)를 포함한다.

[0177] 이등분된 올리고사카라이드를 갖는 항체 변이체가 추가로 제공되는데, 예를 들어 항체의 Fc 영역에 부착된 이중안테나 올리고사카라이드가 GlcNAc에 의해 이등분된다. 이러한 항체 변이체는 푸코실화가 감소될 수 있고/거나 ADCC 기능이 개선될 수 있다. 이러한 항체 변이체의 예가, 예를 들어 WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); 미국 특허 번호 6,602,684 (Umana et al.); 및 US 2005/0123546 (Umana et al.)에 기재되어 있다. Fc 영역에 부착된 올리고사카라이드 내에 적어도 1개의 갈락토스 잔기를 갖는 항체 변이체가 또한 제공된다. 이러한 항체 변이체는 개선된 CDC 기능을 가질 수 있다. 이러한 항체 변이체는 예를 들어 WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); 및 WO 1999/22764 (Raju, S.)에 기재되어 있다.

[0178] **c. Fc 영역 변이체**

[0179] 특정 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 변형이 본원에 제공된 항체의 Fc 영역에 도입되어 Fc 영역 변이체가 생성될 수 있다. Fc 영역 변이체는 하나 이상의 아미노산 위치에서 아미노산 변형 (예를 들어, 치환)을 포함하는 인간 Fc 영역 서열 (예를 들어, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 영역)을 포함할 수 있다.

[0180] 특정 실시양태에서, 본 발명은 모든 이펙터 기능은 아니지만, 몇몇 이펙터 기능을 보유하고 있으므로, 생체내에서의 항체의 반감기가 중요한 하지만 특정의 이펙터 기능 (예컨대 보체 및 ADCC)이 불필요하거나 해로운 많은 적용 분야에 대한 바람직한 후보가 되는 항체 변이체를 고려한다. CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확인하기 위해 시험관내 및/또는 생체내 세포독성 검정을 수행할 수 있다. 예를 들어, 항체에 Fc γ R 결합이 결핍되

어 있지만 (따라서, 아마도 ADCC 활성이 결핍될 것임), FcRn 결합 능력은 보유하고 있는 것을 확인하기 위해서 Fc 수용체 (FcR) 결합 검정을 수행할 수 있다. ADCC를 매개하는 일차 세포인 NK 세포는 Fc γ RIII만을 발현하는 반면에, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RRII 및 Fc γ RIII를 발현한다. 조혈 세포 상에서의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991)]의 페이지 464, 표 3에 요약되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험관내 검정의 비제한적 예가 미국 특허 번호 미국 특허 번호 5,500,362 (예를 들어, 문헌 [Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986) 및 Hellstrom, I et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985)] 참조); 5,821,337 (문헌 [Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)] 참조)에 기재되어 있다. 대안적으로, 비-방사성 검정 방법을 이용할 수 있다 (예를 들어, 유동 세포측정법을 위한 악티(ACTI)TM 비-방사성 세포독성 검정 (셀테크놀로지, 인크.(CellTechnology, Inc.), 캘리포니아주 마운틴 뷰); 및 사이토크스(CytoTox) 96® 비-방사성 세포독성 검정 (프로메가(Promega), 위스콘신주 매디슨) 참조). 이러한 검정에 유용한 이펙터 세포는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 및 자연 킬러(NK) 세포를 포함한다. 대안적으로 또는 추가로, 관심 분자의 ADCC 활성은 생체내에서, 예를 들어 문헌 [Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998)]에 개시된 바와 같은 동물 모델에서 평가할 수 있다. 또한, C1q 결합 검정을 수행하여, 항체가 C1q에 결합할 수 없고, 따라서 CDC 활성이 결핍되었는지를 확인할 수 있다. 예를 들어, WO 2006/029879 및 WO 2005/100402의 C1q 및 C3c 결합 ELISA를 참조한다. 보체 활성화를 평가하기 위해 CDC 검정을 수행할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003); 및 Cragg, M.S. and M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)] 참조). FcRn 결합 및 생체내 제거율/반감기 결정은 또한 당업계에 공지된 방법을 이용하여 수행할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Petkova, S.B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)] 참조).

[0181] 감소된 이펙터 기능을 갖는 항체는 Fc 영역 잔기 238, 265, 269, 270, 297, 327 및 329 중 하나 이상의 치환을 갖는 것을 포함한다 (미국 특허 번호 6,737,056). 이러한 Fc 돌연변이체는 아미노산 위치 265, 269, 270, 297 및 327 중 2개 이상에 치환을 갖는 Fc 돌연변이체 (잔기 265 및 297의 알라닌으로의 치환을 갖는, 소위 "DANA" Fc 돌연변이체 포함)를 포함한다 (미국 특허 번호 7,332,581).

[0182] FcR에 대해 개선되거나 또는 감소된 결합을 갖는 특정 항체 변이체가 기재된다. (예를 들어, 미국 특허 번호 6,737,056; WO 2004/056312, 및 문헌 [Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)] 참조.)

[0183] 특정 실시양태에서, 항체 변이체는 ADCC를 개선하는 하나 이상의 아미노산 치환, 예를 들어 Fc 영역의 위치 298, 333 및/또는 334 (잔기의 EU 넘버링)에서의 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다.

[0184] 일부 실시양태에서, 예를 들어 미국 특허 번호 6,194,551, WO 99/51642, 및 문헌 [Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)]에 기재된 바와 같이, 변경된 (즉, 개선된 또는 감소된) C1q 결합 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC)을 나타내는 변경들이 Fc 영역에서 만들어진다.

[0185] 증가된 반감기, 및 모체 IgG를 태아에게 전달하는 것을 담당하는 신생아 Fc 수용체 (FcRn) (문헌 [Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) 및 Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)])에 대한 개선된 결합을 갖는 항체가 US2005/0014934A1 (Hinton et al.)에 기재되어 있다. 이들 항체는 FcRn에 대한 Fc 영역의 결합을 개선하는 하나 이상의 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다. 이러한 Fc 변이체는 Fc 영역 잔기: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 또는 434 중 하나 이상에서의 치환, 예를 들어 Fc 영역 잔기 434의 치환을 갖는 것을 포함한다 (미국 특허 번호 7,371,826).

[0186] Fc 영역 변이체의 다른 예에 관해서는 또한 문헌 [Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988)]; 미국 특허 번호 5,648,260; 미국 특허 번호 5,624,821; 및 WO 94/29351을 참조한다.

[0187] d. 시스테인 조작된 항체 변이체

[0188] 특정 실시양태에서, 항체의 1개 이상의 잔기를 시스테인 잔기로 치환시킨 시스테인 조작된 항체, 예를 들어 "티오MAB"를 제조하는 것이 바람직할 수 있다. 특정한 실시양태에서, 이와 같이 치환된 잔기는 항체의 접근가능한 부위에서 일어난다. 이들 잔기를 시스테인으로 치환함으로써 반응성 티올기가 항체의 접근가능한 부위에 배치되게 되고, 이것을 이용하여 항체를 본원에 추가로 기재한 바와 같이 다른 모이어티, 예컨대 약물 모이어티 또는 링커-약물 모이어티에 접합시켜 면역접합체를 생성할 수 있다. 특정 실시양태에서, 임의의 1개 이상의 하기 잔기가 시스테인으로 치환될 수 있다: 경쇄의 V205 (카바트 넘버링); 중쇄의 A118 (EU 넘버링); 및 중쇄 Fc 영역의 S400 (EU 넘버링). 시스테인 조작된 항체는, 예를 들어 미국 특허 번호 7,521,541에 기재된 바와 같이 생

성될 수 있다.

[0189] e. 항체 유도체

[0190] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 당업계에서 공지되고 쉽게 입수가 가능한 추가의 비단백질성 잔기를 함유하도록 추가로 변형될 수 있다. 항체의 유도체화에 적합한 모이어티는 수용성 중합체를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 수용성 중합체의 비제한적 예는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레인 무수물 공중합체, 폴리아미노산 (단독중합체 또는 랜덤 공중합체), 및 텍스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜 단독중합체, 폴리프로필렌 옥시드/에틸렌 옥시드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올 (예를 들어, 글리세롤), 폴리비닐 알콜, 및 그의 혼합물을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드가 물에서의 안정성으로 인해 제조에 이점을 가질 수 있다. 중합체는 임의의 분자량을 가질 수 있고, 분지형 또는 비분지형일 수 있다. 항체에 부착된 중합체의 수는 변할 수 있고, 하나 초과와 중합체가 부착될 경우, 중합체들은 동일하거나 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도체화에 사용되는 중합체의 수 및/또는 유형은 개선된 항체의 특정한 특성 또는 기능, 항체 유도체가 규정된 조건 하에 요법에서 사용될 것인지의 여부 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 고려사항을 기반으로 결정될 수 있다.

[0191] 또 다른 실시양태에서, 항체, 및 방사선 노출에 의해 선택적으로 가열될 수 있는 비단백질성 모이어티의 접합체가 제공된다. 한 실시양태에서, 비단백질성 모이어티는 탄소 나노튜브이다 (문헌 [Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005)]). 방사선은 임의의 파장일 수 있고, 통상적인 세포에는 해를 끼치지 않지만 항체-비단백질성 모이어티에 근접한 세포는 사멸시키는 온도로 비단백질성 모이어티를 가열하는 파장을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0192] B. 재조합 방법 및 조성물

[0193] 항체는 재조합 방법 및 조성물을 이용하여, 예를 들어 미국 특허 번호 4,816,567에 기재된 바와 같이 생산할 수 있다. 한 실시양태에서, 본원에 기재된 항-NRG1 항체를 코딩하는 단리된 핵산이 제공된다. 이러한 핵산은 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열 및/또는 VH를 포함하는 아미노산 서열 (예를 들어, 항체의 경쇄 및/또는 중쇄)을 코딩할 수 있다. 추가 실시양태에서, 이러한 핵산을 포함하는 하나 이상의 벡터 (예를 들어, 발현 벡터)가 제공된다. 추가 실시양태에서, 이러한 핵산을 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 이러한 한 실시양태에서, 숙주 세포는 (1) 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열 및 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터, 또는 (2) 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 제1 벡터 및 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 제2 벡터를 포함한다 (예를 들어, 이들로 형질감염됨). 한 실시양태에서, 숙주 세포는 진핵, 예를 들어 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포 또는 림프성 세포 (예를 들어, YO, NSO, Sp20 세포)이다. 한 실시양태에서, 상기에 제공된 바와 같은 항-NRG1 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를 항체의 발현에 적합한 조건 하에 배양하는 것, 및 숙주 세포 (또는 숙주 세포 배양 배지)로부터 상기 항체를 임의로 회수하는 것을 포함하는 항-NRG1 항체를 제조하는 방법이 제공된다.

[0194] 항-NRG1 항체의 재조합 생산을 위해, 예를 들어 상기 기재된 바와 같은 항체를 코딩하는 핵산을 단리하고, 추가의 클로닝 및/또는 숙주 세포에서의 발현을 위해 하나 이상의 벡터에 삽입한다. 이러한 핵산은 통상적인 절차를 이용하여 용이하게 단리하고 서열분석할 수 있다 (예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용하는 것에 의함).

[0195] 항체-코딩 벡터의 클로닝 또는 발현에 적합한 숙주 세포는 본원에 기재된 원핵 또는 진핵 세포를 포함한다. 예를 들어, 특히 글리코실화 및 Fc 이펙터 기능이 필요하지 않을 경우, 항체를 박테리아에서 생산할 수 있다. 박테리아에서의 항체 단편 및 폴리펩티드의 발현에 대해서는, 예를 들어 미국 특허 번호 5,648,237, 5,789,199 및 5,840,523을 참조한다. (또한, 이. 콜라이에서의 항체 단편의 발현이 기재되어 있는 문헌 [Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254] 참조.) 발현 후에, 가용성 분획에서 박테리아 세포 페이스트로부터 항체를 단리할 수 있고, 추가로 정제할 수 있다.

[0196] 원핵생물 뿐만 아니라, 진핵 미생물, 예컨대 글리코실화 경로가 "인간화"되어 항체를 부분적으로 또는 전체적으로 인간 글리코실화 패턴으로 생산되게 하는, 진균 및 효모 균주를 비롯한 사상 진균 또는 효모가 항체-코딩 벡터의 클로닝 또는 숙주 발현에 적합하다. 문헌 [Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004), 및 Li et

al., Nat. Biotech. 24:210-215 (2006)]을 참조한다.

- [0197] 글리코실화 항체의 발현에 적합한 숙주 세포는 또한 다세포 유기체 (무척추동물 및 척추동물)로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 예는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 다수의 바콜로바이러스 균주가 곤충 세포와 함께, 특히 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) 세포를 형질감염시키는데 사용될 수 있는 것으로 확인되어 있다.
- [0198] 식물 세포 배양물을 또한 숙주로서 이용할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978 및 6,417,429 (트랜스제닉 식물에서 항체를 생산하기 위한 플랜티바디스(PLANTIBODIES)™ 기술을 기재함)를 참조한다.
- [0199] 척추동물 세포를 또한 숙주로서 이용할 수 있다. 예를 들어, 현탁액 중에서 성장시키는데 적합한 포유동물 세포주가 유용할 수 있다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 다른 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7); 인간 배아 신장 세포주 (예를 들어, 문헌 [Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)]에 기재된 바와 같은 293 또는 293 세포); 새끼 햄스터 신장 세포 (BHK); 마우스 세르틀리 세포 (예를 들어, 문헌 [Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)]에 기재된 바와 같은 TM4 세포); 원숭이 신장 세포 (CV1); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76); 인간 자궁경부 암종 세포 (HELA); 개 신장 세포 (MDCK); 버팔로 래트 간 세포 (BRL 3A); 인간 폐 세포 (W138); 인간 간 세포 (Hep G2); 마우스 유방 종양 (MMT 060562); 예를 들어 문헌 [Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)]에 기재된 바와 같은 TRI 세포; MRC 5 세포; 및 FS4 세포이다. 다른 유용한 포유동물 숙주 세포주는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포, 예를 들어 DHFR⁻ CHO 세포 (문헌 [Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)]); 및 골수종 세포주, 예컨대 YO, NS0 및 Sp2/0을 포함한다. 항체 생산에 적합한 특정 포유동물 숙주 세포주의 검토를 위해, 예를 들어 문헌 [Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003)]을 참조한다.
- [0200] **C. 검정**
- [0201] 본원에 제공된 NRG1 항체는 당업계에 공지된 다양한 검정에 의해 확인되거나, 스크리닝되거나, 또는 그의 물리적/화학적 특성 및/또는 생물학적 활성에 대해 특성화될 수 있다.
- [0202] 한 측면에서, 본 발명의 항체를 예를 들어 ELISA, 웨스턴 블롯 등과 같은 공지된 방법에 의해 그의 항원 결합 활성에 대해 시험한다.
- [0203] 또 다른 측면에서, 생물학적 활성을 갖는 항-NRG1 항체를 확인하기 위한 검정이 제공된다. 생물학적 활성은 예를 들어 NRG1 유도된 수용체 티로신 키나제 신호전달의 억제, 종양 성장의 억제, 세포 증식의 억제 등을 포함할 수 있다. 생체내 및/또는 시험관내에서 이러한 생물학적 활성을 갖는 항-NRG1 항체가 또한 제공된다.
- [0204] 특정 실시양태에서, 본 발명의 항-NRG1 항체는 이러한 생물학적 활성에 대해 시험된다. 한 실시양태에서, 항-NRG1 항체가 NRG1 유도된 수용체 티로신 키나제 신호전달을 억제하는 능력은 잠재적 항-NRG1 항체의 존재 및 부재 하에 수용체 티로신 키나제의 티로신 잔기의 NRG1 유도된 인산화의 수준을 결정함으로써 측정될 수 있다. 문헌 [Holmes, et al. 1992]. 하기는 수용체 티로신 키나제의 인산화 상태를 결정하기 위한 예시적인 검정이다. Her2 및 Her3을 발현하는 세포 (예컨대 Caov3 세포, 또는 Her2 및 Her3을 발현하도록 조작된 세포)는 잠재적 항-NRG1 항체 또는 완충제 (대조군)와의 60분 예비-인큐베이션 후에 10 nM NRG로 자극시킨다. 전세포 용해물을 항-포스포티로신 항체로 프로빙된 웨스턴 블롯 상에서 분석하여 티로신 인산화의 수준을 결정한다. 블롯을 스캐닝하여 항-포스포티로신 신호를 정량화할 수 있다. 항-NRG1 항체는 완충제 대조군에 비해 티로신 인산화의 수준을 감소시킬 것이다. 한 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 NRG1 유도된 티로신 키나제 신호전달을 비처리 대조군에 비해 적어도 30%, 40%, 50%, 60% 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 억제한다.
- [0205] 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 시험관내에서 세포 성장 또는 증식을 억제하는 그의 능력에 대해 시험된다. 세포 성장 또는 증식의 억제에 대한 검정은 당업계에 널리 공지되어 있다. 본원에 기재된 "세포 사멸" 검정에 의해 예시되는 세포 증식에 대한 특정 검정은 세포 생존율을 측정한다. 한 이러한 검정은 프로메가 (위스콘신주 매디슨)으로부터 상업적으로 입수가 가능한 셀타이터-글로(CellTiter-Glo)™ 발광 세포 생존율 검정이다. 상기 검정은 대사적으로 활성인 세포의 지표인 ATP 존재량의 정량화를 기반으로 하여 배양물 중 생존 세포의 수를 측정한다. 문헌 [Crouch et al. (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88], 미국 특허 번호 6602677을 참조한다. 상기 검정은 자동화된 고처리량 스크리닝 (HTS)에 적용가능한 96- 또는 384-웰 포맷으로 수행될 수 있다.

문헌 [Cree et al. (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404]을 참조한다. 검정 절차는 단일 시약 (셀타이터-글로® 시약)을 배양된 세포에 직접 첨가하는 것을 포함한다. 이는 세포 용해, 및 루시페라제 반응에 의해 생산된 발광 신호의 생성을 일으킨다. 발광 신호는 배양물 중에 존재하는 생존 세포 수에 정비례하는 ATP 존재량에 비례한다. 데이터는 발광측정기 또는 CCD 카메라 영상화 장치에 의해 기록될 수 있다. 발광 출력은 상대적 광 단위 (RLU)로 표현된다.

[0206] 세포 증식에 대한 또 다른 검정은 미토콘드리아 리덕타제에 의한 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라 졸륨 브로마이드의 포르마잔으로의 산화를 측정하는 비색 검정인 "MTT" 검정이다. 셀타이터-글로™ 검정과 마찬가지로, 본 검정은 세포 배양액 내에 존재하는 대사적으로 활성인 세포의 수를 나타낸다. 예를 들어, 문헌 [Mosmann (1983) J. Immunol. Meth. 65:55-63, 및 Zhang et al. (2005) Cancer Res. 65:3877-3882]을 참조한다.

[0207] 한 측면에서, 항-NRG1 항체를 시험관내에서 세포 사멸을 유도하는 그의 능력에 대해 시험한다. 세포 사멸의 유도에 관한 검정은 당업계에 공지되어 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 검정은 예를 들어 프로피듐 아이오다이드 (PI), 트리판 블루 (문헌 [Moore et al. (1995) Cytotechnology, 17:1-11] 참조) 또는 7AAD의 흡수에 의해 표시되는 바와 같이 막 완전성의 상실을 측정한다. 예시적인 PI 흡수 검정에서, 세포는 둘베코 변형 이글 배지 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (D-MEM):햄(Ham) F-12 (50:50) (10% 열-불활성화 FBS (하이클론 (Hyclone)) 및 2 mM L-글루타민이 보충됨) 중에서 배양된다. 따라서, 상기 검정은 보체 및 면역 이펙터 세포의 부재하에 수행된다. 세포를 100 x 20 mm 접시에서 접시당 3×10^6 개의 밀도로 접종하고 밤새 부착되도록 한다. 배지를 제거하고, 이것을 신선한 배지 단독 또는 다양한 농도의 항체 또는 면역접합체를 함유하는 배지로 교체한다. 세포를 3일의 기간 동안 인큐베이션한다. 처리 후, 단층을 PBS로 세척하고, 트립신 처리로 분리한다. 이어서, 세포를 1200 rpm에서 5분 동안 4℃에서 원심분리하고, 펠렛을 3 ml의 차가운 Ca^{2+} 결합 완충제 (10 mM Hepes, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2) 중에 재현탁하고, 35 mm 여과기-뚜껑이 장착된 12 x 75 mm 튜브 (튜브당 1 ml, 처리군당 3개 튜브)로 분주하여 세포 덩어리를 제거한다. 이어서, 튜브에 PI (10 $\mu\text{g/ml}$)를 넣는다. 샘플을 팩스칸(FACSCAN)™ 유동 세포측정기 및 팩스컨버트(FACSCONVERT)™ 셀퀘스트(CellQuest) 소프트웨어 (벡톤 디킨슨(Becton Dickinson))를 사용하여 분석한다. 이어서, PI 흡수에 의해 결정되는 바와 같은, 통계적으로 유의한 수준의 세포 사멸을 유도하는 항체가 확인된다.

[0208] 한 측면에서, 항-NRG1은 시험관내에서 아포토시스 (프로그램화된 세포 사멸)를 유도하는 그의 능력에 대해 시험된다. 아포토시스를 유도하는 항체 또는 면역접합체에 대한 예시적인 검정은 아넥신 결합 검정이다. 예시적인 아넥신 결합 검정에서, 상기 단락에 기재한 바와 같이 세포를 배양하고 접시 내에 접종한다. 배지를 제거하고, 신선한 배지 단독으로 또는 0.001 내지 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 항체 또는 면역접합체를 함유하는 배지로 교체한다. 3일의 인큐베이션 기간 후, 단층을 PBS로 세척하고, 트립신처리에 의해 분리한다. 이어서, 세포를 원심분리하고, Ca^{2+} 결합 완충제에 재현탁시키고, 상기 단락에 논의된 바와 같이 튜브 내로 분취한다. 이어서, 튜브에 표지된 아넥신 (예를 들어 아넥신 V-FITC) (1 $\mu\text{g/ml}$)을 넣는다. 샘플을 팩스칸™ 유동 세포측정기 및 팩스컨버트™ 셀퀘스트 소프트웨어 (BD 바이오사이언시스(BD Biosciences))를 사용하여 분석한다. 대조군에 비해 통계적으로 유의한 수준의 아넥신 결합을 유도하는 항체가 이와 같이 확인된다. 아포토시스를 유도하는 항체 또는 면역접합체에 대한 다른 예시적인 검정은 게놈 DNA의 뉴클레오솜간 분해를 검출하기 위한 히스톤 DNA ELISA 비색 검정이다. 이러한 검정은 예를 들어 세포 사멸 검출 ELISA 키트 (로슈(Roche), 캘리포니아주 팔로 알토)를 이용하여 수행할 수 있다.

[0209] 임의의 상기 시험관내 검정에 사용하기 위한 세포는 자연적으로 NRG1을 발현하거나 또는 NRG1을 발현하도록 조작된 세포 또는 세포주를 포함한다. 이러한 세포는 동일한 조직 기원의 정상 세포에 비해 NRG1을 과다발현하는 종양 세포를 포함한다. 이러한 세포는 또한 NRG1을 발현하는 세포주 (종양 세포주 포함) 및 정상적으로 NRG1을 발현하지 않지만 NRG1을 코딩하는 핵산으로 형질감염된 세포주를 포함한다.

[0210] 한 측면에서, 항-NRG1 항체는 생체내에서 세포 성장 또는 증식을 억제하는 그의 능력에 대해 시험된다. 특정 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 생체내에서 종양 성장을 억제하는 그의 능력에 대해 시험된다. 생체내 모델 시스템, 예컨대 이종이식편 모델은 이러한 시험에 사용될 수 있다. 예시적인 이종이식편 시스템에서, 인간 종양 세포는 적합하게는 면역손상된 비-인간 동물, 예를 들어, 무흉선 "누드" 마우스에 도입된다. 본 발명의 항체는 동물에 투여된다. 종양 성장을 억제하거나 감소시키는 항체의 능력이 측정된다. 상기 이종이식편 시스템의 특정 실시양태에서, 인간 종양 세포는 인간 환자로부터의 종양 세포이다. 이러한 이종이식편 모델은 온코테스트

게엠베하(Oncotest GmbH) (독일 프라이베르그)로부터 상업적으로 입수가 가능하다. 특정 실시양태에서, 인간 종양 세포는 인간 종양 세포주로부터의 세포이다. 특정 실시양태에서, 인간 종양 세포는 피하 주사에 의해 또는 적절한 부위, 예컨대 유방 지방 패드로의 이식에 의해 적합하게 면역손상된 비-인간 동물에 도입된다.

[0211] 특정 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 세포 증식을 비처리 대조군에 비해 적어도 30%, 40%, 50%, 60% 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 억제한다. 다른 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 종양 성장을 비처리 대조군에 비해 적어도 30%, 40%, 50%, 60% 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 억제한다.

[0212] D. 면역접합체

[0213] 본 발명은 또한 하나 이상의 세포독성제, 예컨대 화학요법제 또는 약물, 성장 억제제, 독소 (예를 들어, 단백질 독소, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소 또는 그의 단편) 또는 방사성 동위원소에 접합된 본원의 항-NRG1 항체를 포함하는 면역접합체를 제공한다.

[0214] 한 실시양태에서, 면역접합체는 항체가 메이탄시노이드 (미국 특허 번호 5,208,020, 5,416,064 및 유럽 특허 EP 0 425 235 B1 참조); 아우리스타틴, 예컨대 모노메틸아우리스타틴 약물 모이어티 DE 및 DF (MMAE 및 MMAF) (미국 특허 번호 5,635,483 및 5,780,588, 및 7,498,298 참조); 돌라스타틴; 칼리케아미신 또는 그의 유도체 (미국 특허 번호 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, 및 5,877,296; 문헌 [Hinman et al., Cancer Res. 53:3336-3342 (1993); 및 Lode et al., Cancer Res. 58:2925-2928 (1998)] 참조); 안트라시클린, 예컨대 다우노마이신 또는 독소루비신 (문헌 [Kratz et al., Current Med. Chem. 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters 16:358-362 (2006); Torgov et al., Bioconj. Chem. 16:717-721 (2005); Nagy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529-1532 (2002); King et al., J. Med. Chem. 45:4336-4343 (2002)]; 및 미국 특허 번호 6,630,579); 메토크렉세이트; 빈데신; 탁산, 예컨대 도세탁셀, 파클리탁셀, 라로탁셀, 테세탁셀 및 오르타탁셀; 트리코테센; 및 CC1065를 포함하지만 이에 제한되지는 않은 하나 이상의 약물에 접합된 항체-약물 접합체 (ADC)이다.

[0215] 또 다른 실시양태에서, 면역접합체는 효소 활성 독소 또는 그의 단편 (디프테리아 A 쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 쇄 (슈도모나스 아에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*)로부터 유래됨), 리신 A 쇄, 아브린 A 쇄, 모데신 A 쇄, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디이 (*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 피토라카 아메리카나 (*Phytolacca americana*) 단백질 (PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 (*Momordica charantia*) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 (*sapaonaria officinalis*) 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트리크토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함하나 이에 제한되지는 않음)에 접합된 본원에 기재된 항체를 포함한다.

[0216] 또 다른 실시양태에서, 면역접합체는 방사성접합체를 형성하기 위해 방사성 원자에 접합된 본원에 기재된 바와 같은 항체를 포함한다. 다양한 방사성 동위원소가 방사성접합체의 생산을 위해 이용가능하다. 그 예는 ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{212}Pb , 및 Lu의 방사성 동위원소를 포함한다. 방사성접합체는 검출용으로 사용되는 경우에 신티그래피 연구를 위한 방사성 원자, 예를 들어 tc99m 또는 I123을 포함하거나, 핵자기 공명 (NMR) 영상화 (자기 공명 영상화, mri로도 공지됨)용 스핀 표지, 예컨대 다시 아이오딘-123, 아이오딘-131, 인듐-111, 플루오린-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망가니즈 또는 철을 포함할 수 있다.

[0217] 항체 및 세포독성제의 접합체는 다양한 이관능성 단백질 커플링제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카복실레이트 (SMCC), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예컨대, 디메틸 아디프이미데이트 HCl), 활성 에스테르 (예컨대, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예컨대, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예컨대, 비스 (p-아지도 벤조일) 헥사디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대, 톨루엔 2,6-디이소시아네이트) 및 비스-활성 플루오린 화합물 (예컨대, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al., Science 238:1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이트벤젠-3-메틸디에틸렌 트리 아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 항체에 방사성뉴클레오타이드를 접합시키기 위한 예시적인 킬레이트화제이다. W094/11026을 참조한다. 링커는 세포에서 세포독성 약물의 방출을 용이하게 하는 "절단가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산-불안정성 링커, 펩티다제-감수성 링커, 광분해성 링커, 디메틸 링커 또는 디술폰드-함유 링커 (문헌 [Chari et al., Cancer Res. 52:127-131 (1992)]; 미국 특허 번호 5,208,020)가 사용될 수 있다.

[0218] 본원의 면역접합체 또는 ADC는 상업적으로 입수가 가능한 (예를 들어, 피어스 바이오테크놀로지, 인크.(Pierce Biotechnology, Inc.; 미국 일리노이주 록포드)로부터의) 가교-링커 시약 (BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 술폰-EMCS, 술폰-GMBS, 술폰-KMUS, 술폰-MBS, 술폰-SIAB, 술폰-SMCC 및 술폰-SMPB, 및 SVSB (숙신이미달-(4-비닐술폰)벤조에이트)를 포함하나 이에 제한되지는 않음)으로 제조된 이러한 접합체를 명백하게 고려하나 이에 제한되지는 않는다.

[0219] E. 진단 및 검출을 위한 방법 및 조성물

[0220] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-NRG1 항체는 생물학적 샘플에서 NRG1의 존재를 검출하는데 유용하다. 본원에 사용된 용어 "검출하는"은 정량적 또는 정성적 검출을 포함한다. 특정 실시양태에서, 생물학적 샘플은 세포 또는 조직, 예컨대 폐 조직 또는 유방 조직을 포함한다.

[0221] 한 실시양태에서, 진단 또는 검출 방법에 사용하기 위한 항-NRG1 항체가 제공된다. 추가 측면에서, 생물학적 샘플에서 NRG1의 존재를 검출하는 방법이 제공된다. 특정 실시양태에서, 방법은 본원에 기재된 바와 같은 항-NRG1 항체와 생물학적 샘플을 NRG1에 대한 항-NRG1 항체의 결합을 허용하는 조건 하에 접촉시키는 것, 및 항-NRG1 항체와 NRG1 사이에 복합체가 형성되는지의 여부를 검출하는 것을 포함한다. 이러한 방법은 시험관내 또는 생체내 방법일 수 있다. 한 실시양태에서, 항-NRG1 항체는 예를 들어 NRG1이 환자의 선택을 위한 바이오마커인 경우에 항-NRG1 항체를 사용하는 요법에 적절한 대상체를 선택하는데 사용된다.

[0222] 한 실시양태에서, 환자는 환자가 요법에 내성을 갖거나 이에 내성을 가질 가능성이 있는 암을 갖는 경우에 항-NRG1 항체를 사용하는 치료를 위해 선택된다. 본 발명의 한 측면은 환자가 요법에 내성을 갖거나 이에 내성을 가질 가능성이 있는 암을 갖는지를 결정하는 검정을 제공한다. 한 실시양태에서, 검정은 NRG1 발현을 위해 환자로부터 수득한 종양 세포를 검정하는 것을 포함하며, 여기서 NRG1의 발현이 환자가 요법에 내성을 갖거나 이에 내성이 가질 가능성이 있는 암을 갖는다는 것을 나타낸다. 한 실시양태에서, 환자는 종양에서의 NRG1 발현 수준이 종양의 TRIC에서의 NRG1 발현 수준보다 낮은 경우에 요법에 내성을 갖거나 이에 내성을 가질 가능성이 있는 암을 갖는 환자로서 선택된다.

[0223] 한 실시양태에서, 환자는 환자가 치료제를 사용하는 치료 후에 재발될 가능성이 있는 암을 갖는 경우에 항-NRG1 항체를 사용하는 치료를 위해 선택된다. 본 발명의 한 측면은 환자가 치료제를 사용하는 치료 후에 재발될 가능성이 있는 암을 갖는지를 결정하는 검정을 제공한다. 한 실시양태에서, 검정은 NRG1 발현을 위해 환자로부터 수득한 종양 세포를 검정하는 것을 포함하며, 여기서 NRG1의 발현이 환자가 치료제를 사용하는 치료 후에 재발될 가능성이 있는 암을 갖는다는 것을 나타낸다. 한 실시양태에서, 환자는 종양에서의 NRG1 발현 수준이 종양의 TRIC에서의 NRG1 발현 수준보다 낮은 경우에 치료제를 사용하는 치료 후에 재발될 가능성이 있는 암을 갖는 환자로서 선택된다.

[0224] 특정 실시양태에서, 진단 검정은 예를 들어 면역조직화학, 계내 혼성화 또는 RT-PCR을 이용하여 종양 세포에서 뉴레글린의 발현을 결정하는 것을 포함한다. 다른 실시양태에서, 진단 검정은 예를 들어 정량적 RT-PCR을 이용하여 종양 세포에서 뉴레글린의 발현 수준을 결정하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 진단 검정은 예를 들어 비-암성 인접 조직과 같은 대조군 조직과 비교하여 뉴레글린의 발현 수준을 결정하는 것을 추가로 포함한다.

[0225] 특정 실시양태에서, 표지된 항-NRG1 항체가 제공된다. 표지는 직접적으로 검출되는 표지 또는 모이어티 (예컨대, 형광, 발색, 전자-밀집, 화학발광 및 방사성 표지) 뿐만 아니라 간접적으로, 예를 들어 효소적 반응 또는 분자 상호작용을 통해 검출되는 모이어티, 예컨대 효소 또는 리간드를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 예시적인 표지는 방사성동위원소 ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H 및 ^{131}I , 형광단, 예컨대 희토류 킬레이트 또는 플루오레세인 및 그의 유도체, 로다민 및 그의 유도체, 단질, 움벨리페론, 또는 루시페라제, 예를 들어 반딧불이 루시페라제 및 박테리아 루시페라제 (미국 특허 번호 4,737,456), 루시페린, 2,3-디히드로프탈라진디온, 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP), 알칼리성 포스파타제, β -갈락토시다제, 글루코아밀라제, 리소자임, 사카라이드 옥시다제, 예를 들어 글루코스 옥시다제, 갈락토스 옥시다제, 및 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나제, 염료 전구체를 산화시키기 위해 과산화수소를 사용하는 효소, 예컨대 HRP, 락토퍼옥시다제, 또는 마이크로퍼옥시다제와 커플링된 헤테로시클릭 옥시다제, 예컨대 우리카제 및 크산틴 옥시다제, 비오틴/아비딘, 스핀 표지, 박테리오파지 표지, 안정한 자유 라디칼 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0226] F. 제약 제제

[0227] 본원에 기재된 바와 같은 항-NRG1 항체의 제약 제제는 원하는 정도의 순도를 갖는 상기 항체를 하나 이상의 입

의의 제약상 허용되는 담체 (문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)])와 혼합하여 동결건조 제제 또는 수용액의 형태로 제조한다. 제약상 허용되는 담체는 사용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 기타 유기 산; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산 및 메티오닌; 보존제 (예컨대, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐 피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드 및 기타 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스 또는 텍스트린; 킬레이트화제, 예컨대 EDTA; 당, 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염 형성 반대이온, 예컨대 나트륨; 금속 착체 (예를 들어, Zn-단백질 착체); 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 본원에서 예시적인 제약상 허용되는 담체는 간질성 약물 분산액 작용제, 예컨대 가용성 중성-활성 히알루로니다제 당단백질 (sHASEGP), 예를 들어 인간 가용성 PH-20 히알루로니다제 당단백질, 예컨대 rHuPH20 (힐레넥스(HYLENEX)®, 백스터 인터내셔널, 인크.(Baxter International, Inc.))을 추가로 포함한다. rHuPH20을 포함하는, 특정 예시적인 sHASEGP 및 사용 방법은 미국 특허 공개 번호 2005/0260186 및 2006/0104968에 기재되어 있다. 한 측면에서, sHASEGP는 하나 이상의 추가의 글리코사미노글리카나제, 예컨대 콘드로이티나제와 조합된다.

[0228] 예시적인 동결건조 항체 제제는 미국 특허 번호 6,267,958에 기재되어 있다. 수성 항체 제제는 미국 특허 번호 6,171,586 및 W02006/044908에 기재된 것을 포함하고, 후자의 제제는 히스티딘-아세테이트 완충제를 포함한다.

[0229] 또한, 본원에서 제제는 또한 치료되는 특정한 적응증에 필요한 하나 초과와 활성 성분, 바람직하게는 서로 유해한 영향을 주지 않는 보완적 활성을 갖는 것을 함유할 수 있다. 예를 들어, 파클리탁셀, 카르보플라틴 및 시스플라틴, 또는 파클리탁셀, 카르보플라틴 및 시스플라틴 중 2개 또는 3개 모두의 조합을 추가로 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 또 다른 예에서, 항-HER 항체를 추가로 제공하는 것을 바람직할 수 있다. 이러한 활성 성분은 의도된 목적에 유효한 양으로 조합되어 적합하게 존재한다.

[0230] 활성 성분은 예를 들어 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로구체, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐)에서 또는 마크로에멀전에서 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합에 의해 제조되는 마이크로캡슐, 예를 들어 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에 봉입될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 개시되어 있다.

[0231] 지속-방출 제제를 제조할 수 있다. 지속-방출 제제의 적합한 예는 항체 또는 면역접합체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하고, 이 매트릭스는 성형품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다.

[0232] 생체내 투여에 사용되는 제제는 일반적으로 멸균된다. 멸균은 예를 들어 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성할 수 있다.

[0233] G. 치료 방법 및 조성물

[0234] 본원에 제공된 항-NRG1 항체는 치료 방법에 사용될 수 있다.

[0235] 본 발명의 한 측면은 암을 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명의 한 측면은 환자에게 항-NRG1 항체를 투여하여 환자에서 치료제를 사용하는 치료에 대한 내성을 예방하는 방법을 제공한다. 본 발명의 또 다른 측면은 환자에게 항-NRG1 항체를 투여하는 치료제를 사용하는 치료 후에 암의 재발을 예방하는 방법을 제공한다.

[0236] 구체적 측면은 환자에게 유효량의 항-NRG1 항체를 투여하는 것을 포함하는, 암 재발을 예방하거나 종양 재발까지의 시간을 증가시키는 방법을 포함한다. 한 실시양태에서, 환자는 치료제, 예컨대 화학요법제 또는 항원 결합 작용제, 예컨대 항체로 치료된다. 한 실시양태에서, 암은 종양 재개시 세포를 포함한다. 한 실시양태에서, 암은 비소세포 폐암이다. 한 실시양태에서, 암은 유방암이다. 한 실시양태에서, 환자는 화학요법제로 치료된다. 한 실시양태에서, 화학요법제는 암의 치유적 치료의 표준으로 사용되는 작용제이다. 한 실시양태에서, 화학요법제는 겐시타빈, 파클리탁셀 또는 시스플라틴, 또는 파클리탁셀 및 시스플라틴의 조합이다. 한 실시양태에서, 화학요법제는 티로신 키나제 억제제가 아니다. 또 다른 실시양태에서, 화학요법제는 티로신 키나제 억제제이다. 한 실시양태에서, 화학요법제는 억제제 EGFR, HER2, HER3 및/또는 HER4이다. 또 다른 실시양태는 화학

요법제를 환자에게 항-NRG1 항체와 조합하여 추가로 투여하는 것을 포함한다.

- [0237] 또 다른 실시양태에서, 환자는 항체로 치료된다. 한 실시양태에서, 항체는 항-티로신 키나제 항체이다. 한 실시양태에서, 항체는 EGFR, HER2, HER3 및/또는 HER4 항체이다. 또 다른 실시양태는 항체를 환자에게 항-NRG1 항체와 조합하는 추가로 투여하는 것을 포함한다.
- [0238] 특정 실시양태에서, 중앙 재발까지의 시간은 항-NRG1 항체의 부재 하의 중앙 재발까지의 시간보다 적어도 1.25, 1.50, 1.75, 2.0, 2.5, 5.0, 10, 20 또는 50배 더 크다.
- [0239] 또 다른 측면은 환자에게 유효량의 항-NRG1 항체를 투여하는 것을 포함하는, 내성 암을 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 암은 중앙 재개시 세포를 포함한다. 한 실시양태에서, 암은 비소세포 폐암이다. 한 실시양태에서, 암은 유방암이다. 한 실시양태에서, 암은 화학요법제를 사용하는 치료에 대한 내성을 갖는다. 한 실시양태에서, 암은 겐시타빈, 파클리탁셀, 카르보플라틴 및 시스플라틴, 또는 파클리탁셀, 카르보플라틴 및 시스플라틴 중 2개 또는 3개 모두의 조합을 사용하는 치료에 대한 내성을 갖는다. 한 실시양태에서, 암은 티로신 키나제 억제제를 사용하는 치료에 대한 내성을 갖는다. 한 실시양태에서, 암은 EGFR, HER2, HER3 및/또는 HER4 억제제를 사용하는 치료에 대한 내성을 갖는다. 또 다른 실시양태는 화학요법제를 환자에게 추가로 투여하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 화학요법제는 겐시타빈, 파클리탁셀, 카르보플라틴 및 시스플라틴, 또는 파클리탁셀, 카르보플라틴 및 시스플라틴 중 2개 또는 3개 모두의 조합이다. 한 실시양태에서, 화학요법제는 EGFR, HER2, HER3 및/또는 HER4 억제제이다.
- [0240] 한 실시양태에서, 암은 치료 항체를 사용하는 치료에 대한 내성을 갖는다. 한 실시양태에서, 암은 EGFR, HER2, HER3 또는 HER4 항체를 사용하는 치료에 대한 내성을 갖는다. 또 다른 실시양태는 항체를 환자에게 추가로 투여하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 항체는 트라스투주맙 또는 페르투주맙이다.
- [0241] 또 다른 측면은 암을 갖는 환자에게 유효량의 항-NRG1 항체 및 치료제를 투여하는 것을 포함하는, 암에서 내성을 예방하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 암은 중앙 재개시 세포를 포함한다. 한 실시양태에서, 암은 비소세포 폐암이다. 한 실시양태에서, 암은 유방암이다. 한 실시양태에서, 암은 화학요법제를 사용하는 치료에 대한 내성을 갖는다. 한 실시양태에서, 암은 겐시타빈, 파클리탁셀, 카르보플라틴 및 시스플라틴, 또는 파클리탁셀, 카르보플라틴 및 시스플라틴 중 2개 또는 3개 모두의 조합을 사용한 치료에 대한 내성을 갖는다. 한 실시양태에서, 화학요법제는 티로신 키나제 억제제가 아니다. 또 다른 실시양태에서, 화학요법제는 티로신 키나제 억제제이다. 한 실시양태에서, 화학요법제는 억제제 EGFR, HER2, HER3 및/또는 HER4이다. 또 다른 실시양태는 화학요법제를 환자에게 투여하는 것을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 화학요법제는 겐시타빈, 파클리탁셀, 카르보플라틴 및 시스플라틴, 또는 파클리탁셀, 카르보플라틴 및 시스플라틴 중 2개 또는 3개 모두의 조합이다.
- [0242] 한 실시양태에서, 암은 치료 항체를 사용하는 치료에 대한 내성을 갖는다. 한 실시양태에서, 암은 EGFR, HER2, HER3 또는 HER4 항체를 사용하는 치료에 대한 내성을 갖는다. 또 다른 실시양태는 항체를 환자에게 투여하는 것을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 항체는 트라스투주맙 또는 페르투주맙이다.
- [0243] 특정 실시양태에서, 치료 방법에 사용하기 위한 항-NRG1 항체가 제공된다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 암을 갖는 개체에게 유효량의 항-NRG1 항체를 투여하는 것을 포함하는, 암을 갖는 개체를 치료하는 방법에 사용하기 위한 항-NRG1 항체를 제공한다. 한 이러한 실시양태에서, 방법은 개체에게 예를 들어 하기 기재된 바와 같은 하나 이상의 추가의 치료제의 유효량을 투여하는 것을 추가로 포함한다. 추가 실시양태에서, 본 발명은 암의 재발을 경험한 환자를 치료하는데 사용하기 위한 항-NRG1 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 개체에게 유효량의 항-NRG1 항체를 투여하여 치료제에 대한 내성을 예방하는 것을 포함하는, 개체에서 치료제를 사용하는 치료에 대한 내성을 예방하는 방법에 사용하기 위한 항-NRG1 항체를 제공한다.
- [0244] 추가 측면에서, 본 발명은 의약의 제작 또는 제조에 있어서 항-NRG1 항체의 용도를 제공한다. 한 실시양태에서, 의약은 암의 치료를 위한 것이다. 추가 실시양태에서, 의약은 암을 갖는 개체에게 유효량의 의약을 투여하는 것을 포함하는 암을 치료하는 방법에서 사용하기 위한 것이다. 한 이러한 실시양태에서, 방법은 개체에게 예를 들어 하기 기재된 바와 같은 하나 이상의 추가의 치료제를 유효량으로 투여하는 것을 추가로 포함한다. 추가 실시양태에서, 의약은 환자에서 치료제를 사용하는 치료에 대한 내성을 예방하기 위한 것이다. 추가 실시양태에서, 의약은 환자에서 암의 재발을 예방하기 위한 것이다.
- [0245] 추가 측면에서, 본 발명은 예를 들어 임의의 상기 치료 방법에 사용하기 위해, 본원에 제공된 임의의 항-NRG1 항체를 포함하는 제약 제제를 제공한다. 한 실시양태에서, 제약 제제는 본원에 제공된 임의의 항-NRG1 항체 및

제약상 허용되는 담체를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 제약 제제는 예를 들어 아래 기재된 바와 같은 본원에 제공된 항-NRG1 항체 및 하나 이상의 추가의 치료제를 포함한다.

[0246] 본 발명의 항체는 요법에서 단독으로 또는 기타 작용제와 조합하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 하나 이상의 추가의 치료제와 공동-투여될 수 있다. 추가의 치료제의 예는 하기 기재된다.

[0247] 상기 언급된 이러한 조합 요법은 조합 투여 (여기서 2종 이상의 치료제가 동일한 또는 개별 제제에 포함됨), 및 개별 투여를 포함하고, 이 경우에 본 발명의 항체의 투여는 추가의 치료제 및/또는 아주반트의 투여 전에, 그와 동시에 및/또는 그 후에 수행될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 방사선 요법과 조합되어 사용될 수도 있다.

[0248] 본 발명의 항체 (및 임의의 추가의 치료제)는 비경구, 폐내 및 비강내를 포함하여 임의의 적합한 수단에 의해 투여될 수 있고, 원하는 경우에 국부 치료를 위해 병변내 투여될 수 있다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다. 투여는 임의의 적합한 경로, 예를 들어 부분적으로는 투여가 단기적인지 장기적인지에 따라 정맥내 또는 피하 주사와 같은 주사에 의해 수행될 수 있다. 단일 투여 또는 다양한 시점에 걸친 다중 투여, 볼루스 투여 및 펄스 주입을 비롯한 (이에 제한되지는 않음) 다양한 투여 스케줄이 본원에서 고려된다.

[0249] 본 발명의 항체는 우수한 의료 행위와 일치하는 방식으로 제제화되고 투약되고 투여될 것이다. 이와 관련하여 고려할 인자는 치료할 특정한 장애, 치료할 특정한 포유동물, 개별 환자의 임상적 상태, 장애의 원인, 작용제의 전달 부위, 투여 방법, 투여 스케줄링, 및 진료의에게 공지된 다른 인자를 포함한다. 항체는 반드시 그럴 필요는 없지만, 임의로 해당 장애를 예방 또는 치료하는데 현재 사용되는 하나 이상의 작용제와 함께 제제화된다. 이러한 다른 작용제의 유효량은 제제 내에 존재하는 항체의 양, 장애 또는 치료의 유형, 및 상기 논의된 다른 인자에 따라 달라진다. 이는 일반적으로 상기 기재된 바와 동일한 투여량 및 투여 경로로, 또는 본원에 기재된 투여량의 약 1 내지 99%로, 또는 실험적으로/임상적으로 적절한 것으로 결정된 임의의 투여량 및 경로에 의해 사용된다.

[0250] 질환의 예방 또는 치료를 위해, 본 발명의 항체의 적절한 투여량 (단독으로, 또는 하나 이상의 다른 추가의 치료제와 조합하여 사용되는 경우)은 치료할 질환의 유형, 항체의 유형, 질환의 중증도 및 경과, 항체가 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지의 여부, 선행 요법, 환자의 임상 병력 및 항체에 대한 반응, 및 담당의의 판단에 따라 달라질 것이다. 항체는 한번에 또는 일련의 치료에 걸쳐 환자에게 적합하게 투여된다. 질환의 유형 및 중증도에 따라, 예를 들어 1회 이상의 개별 투여에 의해서든 아니면 연속 주입에 의해서든 상관없이, 약 1 μ g/kg 내지 15 mg/kg (예를 들어, 0.1 mg/kg 내지 10 mg/kg)의 항체가 환자에게 투여하기 위한 초기 후보 투여량일 수 있다. 한 가지 전형적인 1일 투여량은 상기 언급된 인자에 따라 약 1 μ g/kg 내지 100 mg/kg 또는 그 초과 범위일 수 있다. 수일 이상에 걸친 반복 투여의 경우, 치료는 일반적으로 상태에 따라 질환 증상의 원하는 저해가 일어날 때까지 지속될 것이다. 한 예시적인 항체 투여량은 약 0.05 mg/kg 내지 약 10 mg/kg 범위일 것이다. 따라서, 약 0.5 mg/kg, 2.0 mg/kg, 4.0 mg/kg 또는 10 mg/kg (또는 그의 임의의 조합) 중 하나 이상의 용량이 환자에게 투여될 수 있다. 이러한 용량은 간헐적으로, 예를 들어 매주 또는 3주마다 투여될 수 있다 (예를 들어, 약 2회 내지 약 20회, 또는 예를 들어 약 6회 용량의 항체가 환자에게 제공되도록 투여됨). 보다 높은 초기 부하 용량을 투여한 후, 1회 이상의 보다 낮은 용량을 투여할 수 있다. 이러한 요법의 진행은 통상의 기술 및 검정에 의해 용이하게 모니터링된다.

[0251] 임의의 상기 제제 또는 치료 방법은 항-NRG1 항체를 대신하여 또는 이에 더하여 본 발명의 면역접합체를 사용하여 수행될 수 있는 것으로 이해된다.

[0252] 추가의 치료제

[0253] 특정 실시양태에서, 추가의 치료제는 티로신 키나제 수용체 경로를 억제하는 작용제이다. 한 실시양태에서, 추가의 치료제는 HER 경로를 억제한다. 한 실시양태에서, 추가의 치료제는 EGFR, HER2, HER3 및/또는 HER4의 억제제이다.

[0254] 본원에 사용된 용어 "EGFR 억제제"는 EGFR에 결합하거나 또는 다르게는 EGFR과 직접 상호작용하고, 그의 신호전달 활성을 방지하거나 감소시키는 화합물을 지칭하고, 대안적으로 "EGFR 길항제"로 지칭된다. 이러한 작용제의 예는 EGFR에 결합하는 항체 및 소분자를 포함한다. EGFR에 결합하는 항체의 예는 MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (미국 특허 번호 4,943,533 (Mendelsohn et al.) 참조) 및 그의 변이체, 예컨대 키메라화 225 (C225 또는 세톡시맵; 에르부티스 (ERBUTIX)®) 및 재형성된 인간 225 (H225) (WO 96/40210 (임클론 시스템즈 인크.(Imclone Systems Inc.)) 참

조); IMC-11F8, 완전 인간, EGFR-표적화 항체 (임클론); 유형 II 돌연변이체 EGFR에 결합하는 항체 (미국 특허 번호 5,212,290); 미국 특허 번호 5,891,996에 기재된 바와 같은 EGFR에 결합하는 인간화 및 키메라 항체; 및 EGFR에 결합하는 인간 항체, 예컨대 ABX-EGF 또는 파니투무맙 (WO98/50433 (아브게닉스(Abgenix)/암젠(Amgen)) 참조); EMD 55900 (문헌 [Stragliotto et al. Eur. J. Cancer 32A:636-640 (1996)]); EGFR 결합에 대해 EGF 및 TGF-알파 둘 다와 경쟁하는 EGFR에 대해 지시된 인간화 EGFR 항체인 EMD7200 (마투주맙) (EMD/머크 (Merck)); 인간 EGFR 항체, 휴맥스(HuMax)-EGFR (진맵(GenMab)); E1.1, E2.4, E2.5, E6.2, E6.4, E2.11, E6.3 및 E7.6.3으로 공지되고, US 6,235,883에 기재된 완전 인간 항체; MDX-447 (메다렉스 인크(Medarex Inc)); 및 mAb 806 또는 인간화 mAb 806 (문헌 [Johns et al., J. Biol. Chem. 279(29):30375-30384 (2004)])을 포함한다. 항-EGFR 항체는 세포독성제와 접합되어 면역접합체를 생성할 수 있다 (예를 들어, EP659,439A2 (머크 페이턴트 케엠베하(Merck Patent GmbH)) 참조). EGFR 길항제는 소분자, 예컨대 미국 특허 번호 5,616,582, 5,457,105, 5,475,001, 5,654,307, 5,679,683, 6,084,095, 6,265,410, 6,455,534, 6,521,620, 6,596,726, 6,713,484, 5,770,599, 6,140,332, 5,866,572, 6,399,602, 6,344,459, 6,602,863, 6,391,874, 6,344,455, 5,760,041, 6,002,008, 및 5,747,498 뿐만 아니라 하기 PCT 공보: WO98/14451, WO98/50038, WO99/09016, 및 WO99/24037에 기재된 화합물을 포함한다. 특정한 소분자 EGFR 길항제는 OSI-774 (CP-358774, 에를로티닙, 타르세바(TARCEVA)® 제넨테크/OSI 파마슈티칼스(OSI Pharmaceuticals)); PD 183805 (CI 1033, 2-프로펜아미드, N-[4-[(3-클로로-4-플루오로페닐)아미노]-7-[3-(4-모르폴리닐)프로폭시]-6-퀴나졸리닐]-, 디히드로클로라이드, 화이자 인크.(Pfizer Inc.)); ZD 1839, 게피티닙 (이레사(IRESSA)™) 4-(3'-클로로-4'-플루오로아닐리노)-7-메톡시-6-(3-모르폴리노프로폭시)퀴나졸린, (아스트라제네카(AstraZeneca)); ZM 105180 ((6-아미노-4-(3-메틸페닐-아미노)-퀴나졸린, 제네카(Zeneca)); BIBX-1382 (N8-(3-클로로-4-플루오로-페닐)-N2-(1-메틸-피페리딘-4-일)-피리미도[5,4-d]피리미딘-2,8-디아민, 베링거 잉겔하임(Boehringer Ingelheim)); PKI-166 ((R)-4-[4-[(1-페닐에틸)아미노]-1H-피롤로[2,3-d]피리미딘-6-일]-페놀); (R)-6-(4-히드록시페닐)-4-[(1-페닐에틸)아미노]-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘); CL-387785 (N-[4-[(3-브로모페닐)아미노]-6-퀴나졸리닐]-2-부틴아미드); EKB-569 (N-[4-[(3-클로로-4-플루오로페닐)아미노]-3-시아노-7-에톡시-6-퀴놀리닐]-4-(디메틸아미노)-2-부텐아미드) (와이어쓰(Wyeth)); AG1478 (화이자); AG1571 (SU 5271; 화이자); 이중 EGFR/HER2 티로신 키나제 억제제, 예컨대 라파티닙 (타이커브(TYKERB)®, GSK572016 또는 N-[3-클로로-4-[(3-플루오로페닐)메톡시]페닐]-6[5[[[2메틸술포닐)에틸]아미노]메틸]-2-푸라닐]-4-퀴나졸린아민; 글락소-스미스클라인(Glaxo-SmithKline))을 포함한다.

[0255] 본원에 사용된 용어 "HER2 억제제"는 HER2에 결합하거나 또는 다르게는 HER2와 직접 상호작용하고, 그의 신호전달 활성을 방지하거나 감소시키는 화합물을 지칭하고, 대안적으로 "HER2 길항제"로 지칭된다. 이러한 작용제의 예는 HER2에 결합하는 항체 및 소분자를 포함한다. 특정한 HER2 항체는 페르투주맙 및 트라스투주맙을 포함한다. 본원에 사용된 용어 "HER3 억제제"는 HER3에 결합하거나 또는 다르게는 HER3과 직접 상호작용하고, 그의 신호전달 활성을 방지하거나 감소시키는 화합물을 지칭하고, 대안적으로 "HER3 길항제"로 지칭된다. 이러한 작용제의 예는 HER3에 결합하는 항체 및 소분자를 포함한다. 본원에 사용된 용어 "HER4 억제제"는 HER4에 결합하거나 또는 다르게는 HER4와 직접 상호작용하고, 그의 신호전달 활성을 방지하거나 감소시키는 화합물을 지칭하고, 대안적으로 "HER4 길항제"로 지칭된다. 이러한 작용제의 예는 HER4에 결합하는 항체 및 소분자를 포함한다.

[0256] HER 항체와 관련된 특허 공개는 하기를 포함한다: 미국 특허 번호 5,677,171, 미국 특허 번호 5,720,937, 미국 특허 번호 5,720,954, 미국 특허 번호 5,725,856, 미국 특허 번호 5,770,195, 미국 특허 번호 5,772,997, 미국 특허 번호 6,165,464, 미국 특허 번호 6,387,371, 미국 특허 번호 6,399,063, US2002/0192211A1, 미국 특허 번호 6,015,567, 미국 특허 번호 6,333,169, 미국 특허 번호 4,968,603, 미국 특허 번호 5,821,337, 미국 특허 번호 6,054,297, 미국 특허 번호 6,407,213, 미국 특허 번호 6,719,971, 미국 특허 번호 6,800,738, US2004/0236078A1, 미국 특허 번호 5,648,237, 미국 특허 번호 6,267,958, 미국 특허 번호 6,685,940, 미국 특허 번호 6,821,515, WO98/17797, 미국 특허 번호 6,333,398, 미국 특허 번호 6,797,814, 미국 특허 번호 6,339,142, 미국 특허 번호 6,417,335, 미국 특허 번호 6,489,447, WO99/31140, US2003/0147884A1, US2003/0170234A1, US2005/0002928A1, 미국 특허 번호 6,573,043, US2003/0152987A1, WO99/48527, US2002/0141993A1, WO01/00245, US2003/0086924, US2004/0013667A1, WO00/69460, WO01/00238, WO01/15730, 미국 특허 번호 6,627,19681, 미국 특허 번호 6,632,979B1, WO01/00244, US2002/0090662A1, WO01/89566, US2002/0064785, US2003/0134344, WO 04/24866, US2004/0082047, US2003/0175845A1, WO03/087131, US2003/0228663, WO2004/008099A2, US2004/0106161, WO2004/048525, US2004/0258685A1, 미국 특허 번호

5,985,553, 미국 특허 번호 5,747,261, 미국 특허 번호 4,935,341, 미국 특허 번호 5,401,638, 미국 특허 번호 5,604,107, WO 87/07646, WO 89/10412, WO 91/05264, EP 412,116 B1, EP 494,135 B1, 미국 특허 번호 5,824,311, EP 444,181 B1, EP 1,006,194 A2, US 2002/0155527A1, WO 91/02062, 미국 특허 번호 5,571,894, 미국 특허 번호 5,939,531, EP 502,812 B1, WO 93/03741, EP 554,441 B1, EP 656,367 A1, 미국 특허 번호 5,288,477, 미국 특허 번호 5,514,554, 미국 특허 번호 5,587,458, WO 93/12220, WO 93/16185, 미국 특허 번호 5,877,305, WO 93/21319, WO 93/21232, 미국 특허 번호 5,856,089, WO 94/22478, 미국 특허 번호 5,910,486, 미국 특허 번호 6,028,059, WO 96/07321, 미국 특허 번호 5,804,396, 미국 특허 번호 5,846,749, EP 711,565, WO 96/16673, 미국 특허 번호 5,783,404, 미국 특허 번호 5,977,322, 미국 특허 번호 6,512,097, WO 97/00271, 미국 특허 번호 6,270,765, 미국 특허 번호 6,395,272, 미국 특허 번호 5,837,243, WO 96/40789, 미국 특허 번호 5,783,186, 미국 특허 번호 6,458,356, WO 97/20858, WO 97/38731, 미국 특허 번호 6,214,388, 미국 특허 번호 5,925,519, WO 98/02463, 미국 특허 번호 5,922,845, WO 98/18489, WO 98/33914, 미국 특허 번호 5,994,071, WO 98/45479, 미국 특허 번호 6,358,682 B1, US 2003/0059790, WO 99/55367, WO 01/20033, US 2002/0076695 A1, WO 00/78347, WO 01/09187, WO 01/21192, WO 01/32155, WO 01/53354, WO 01/56604, WO 01/76630, WO02/05791, WO 02/11677, 미국 특허 번호 6,582,919, US2002/0192652A1, US 2003/0211530A1, WO 02/44413, US 2002/0142328, 미국 특허 번호 6,602,670 B2, WO 02/45653, WO 02/055106, US 2003/0152572, US 2003/0165840, WO 02/087619, WO 03/006509, WO03/012072, WO 03/028638, US 2003/0068318, WO 03/041736, EP 1,357,132, US 2003/0202973, US 2004/0138160, 미국 특허 번호 5,705,157, 미국 특허 번호 6,123,939, EP 616,812 B1, US 2003/0103973, US 2003/0108545, 미국 특허 번호 6,403,630 B1, WO 00/61145, WO 00/61185, 미국 특허 번호 6,333,348 B1, WO 01/05425, WO 01/64246, US 2003/0022918, US 2002/0051785 A1, 미국 특허 번호 6,767,541, WO 01/76586, US 2003/0144252, WO 01/87336, US 2002/0031515 A1, WO 01/87334, WO 02/05791, WO 02/09754, US 2003/0157097, US 2002/0076408, WO 02/055106, WO 02/070008, WO 02/089842, WO 03/86467 및 US 2010/0255010.

[0257]

특정 실시양태에서, 추가의 치료제는 화학요법제이다. "화학요법제"는 암의 치료에 유용한 화학적 화합물을 지칭한다. 화학요법제의 예는 알킬화제, 예컨대 티오테파 및 시클로스포스파미드 (시톡산(CYTOXAN)®); 알킬 술포네이트, 예컨대 부술포, 임프로술포 및 피포술포; 아지리딘, 예컨대 벤조도파, 카르보쿠온, 메트우레도파 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸라멜라민 (알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포르아미드 및 트리메틸로멜라민 포함); 아세토게닌 (특히 불라타신 및 불라타시논); 델타-9-테트라히드로칸나비놀 (드로나비놀, 마리놀(MARINOL)®); 베타-라파콘; 라파콜; 콜키신; 베툴린산; 캄프토테신 (합성 유사체 토포테칸 (하이캄틴(HYCANTIN)®) 포함), CPT-11 (이리노테칸, 캄프토사르(CAMPTOSAR)®), 아세틸캄프토테신, 스코폴렉틴, 및 9-아미노캄프토테신); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (그의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 포도필로톡신; 포도필린산; 테니포시드; 크립토피신 (특히 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 돌라스타틴; 두오카르마이신 (합성 유사체, KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; 사르코딕티인; 스폰지스타틴; 질소 머스타드, 예컨대 클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스파미드, 에스 트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노벤비킨, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 라니무스틴; 항생제, 예컨대 에네디인 항생제 (예를 들어, 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마II 및 칼리케아미신 오메가II (예를 들어, 문헌 [Nicolaou et al., Angew. Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)] 참조); CDP323, 경구 알파-4 인테그린 억제제; 디네미신 (디네미신 A 포함); 에스페라미신; 뿐만 아니라 네오키노스타틴 발색단 및 관련 색소단백질 에네디인 항생제 발색단, 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신 (아드리아마이신(ADRIAMYCIN)®, 모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신, 독소루비신 HCl 리포솜 주사 (독실(DOXIL)®), 리포솜 독소루비신 TLC D-99 (미오세트(MYOCET)®), PEG화 리포솜 독소루비신 (케릭스(CAELYX)®) 및 데옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예컨대 미토마이신 C, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포르피로마이신, 퓨로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니벡스, 지노스타틴, 조루비신; 항대사물, 예컨대 메토포렉세이트, 겐시타빈 (겐자르(GEMZAR)®), 테가푸르 (유포토랄(UFTORAL)®), 카페시타빈 (젤로다(XELODA)®), 에포틸론, 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 폴산 유사체, 예컨대 데노프테린, 메토포렉세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예컨대 플루다라빈, 6-메르캅토피리딘, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타

라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘; 안드로겐, 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토락톤; 항부신제, 예컨대 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 폴산 보충제, 예컨대 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트렉세이트; 테포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘립티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다이인; 메이탄시노이드, 예컨대 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단물; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK® 폴리사카라이드 복합체 (JHS 내추럴 프로덕츠 (JHS Natural Products), 오레곤주 유진); 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2'-트리클로로트리메틸아민; 트리코테센 (특히 T-2 독소, 베라큐린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신 (엘디신(ELDISINE)®, 필데신(FILDESIN)®); 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로탄; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 티오테파; 탁소이드, 예를 들어, 파클리탁셀 (탁솔(TAXOL)®), 파클리탁셀의 알부민-조작된 나노입자 제제 (아브락산(ABRAXANE)™), 및 도세탁셀 (탁소테레(TAXOTERE)®); 클로란부실; 6-티오구아닌; 메르캅토피린; 메토틱세이트; 백금 유사체, 예컨대 시스플라틴, 옥살리플라틴 (예를 들어, 엘록사틴(ELOXATIN)®) 및 카르보플라틴; 빈블라스틴 (벨반(VELBAN)®), 빈크리스틴 (온코빈(ONCOVIN)®), 빈데신 (엘디신®, 필데신®), 및 비노렐빈 (나벨빈(NAVELBINE)®)을 비롯한, 튜블린 중합이 미세소관을 형성하는 것을 방지하는 빈카; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 류코보린; 노반트론; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 이반드로네이트; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드, 예컨대 레티노산 (백사로텐 (탈그레틴(TARGRETIN)®) 포함); 비스포스포네이트, 예컨대 클로드로네이트 (예를 들어, 보네포스(BONEFOS)® 또는 오스타크(OSTAC)®), 에티드로네이트 (디드로칼(DIDROCAL)®), NE-58095, 졸레드론산/졸레드로네이트 (조메타(ZOMETA)®), 알렌드로네이트 (포사맥스(FOSAMAX)®), 파미드로네이트 (아레디아(AREDIA)®), 티루드로네이트 (스켈리드(SKELID)®), 또는 리세드로네이트 (악토넬(ACTONEL)®); 트록사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히 이상 세포 증식에 관여하는 신호전달 경로에서 유전자의 발현을 억제하는 것, 예를 들어 PKC-알파, Raf, H-Ras, 및 표피 성장 인자 수용체 (EGF-R); 백신, 예컨대 테라토프(THERATOPE)® 백신 및 유전자 요법 백신, 예를 들어 알로벡틴(ALLOVECTIN)® 백신, 류벡틴(LEUVECTIN)® 백신, 및 박시드(VAXID)® 백신; 토포이소머라제 1 억제제 (예를 들어, 루르토테칸(LURTOTECAN)®); rmRH (예를 들어, 아바렐릭스(ABARELIX)®); BAY439006 (소라페닙; 바이엘(Bayer)); SU-11248 (수니티닙, 수텐트(SUTENT)®, 화이자(Pfizer)); 페리포신, COX-2 억제제 (예를 들어, 셀레콕시브 또는 에토리콕시브), 프로테오솜 억제제 (예를 들어, PS341); 보르테조미드 (벨케이드(VELCADE)®); CCI-779; 티피파르닙 (R11577); 오라페닙, ABT510; Bcl-2 억제제, 예컨대 오블리메르센 나트륨 (게나센스(GENASENSE)®); 꺾산트론; EGFR 억제제 (하기 정의 참조); 티로신 키나제 억제제 (하기 정의 참조); 세린-트레오닌 키나제 억제제, 예컨대 라파마이신 (시롤리무스, 라파뮌(RAPAMUNE)®); 파르네실트랜스퍼라제 억제제, 예컨대 로나파르닙 (SCH 6636, 사라사르(SARASAR)™); 및 상기 임의의 작용제의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체; 뿐만 아니라 상기 중 2개 이상의 조합물, 예컨대 CHOP (시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴 및 프레드니솔론의 조합 요법에 대한 약어) 및 FOLFOX (5-FU 및 류코보린과 조합된 옥살리플라틴 (엘록사틴™)을 사용하는 치료 요법에 대한 약어)를 포함한다.

[0258]

본원에 정의된 바와 같은 화학요법제는 암의 성장을 촉진할 수 있는 호르몬의 효과를 조절, 감소, 차단 또는 억제하는 작용을 하는 "항호르몬 작용제" 또는 "내분비 치료제"를 포함한다. 이들은 혼합된 효능제/길항제 프로파일을 갖는 항에스트로겐, 예를 들어 타목시펜 (놀바덱스(NOLVADEX)®), 4-히드록시타목시펜, 토레미펜 (파레스톤(FARESTON)®), 이독시펜, 드롤록시펜, 랄록시펜 (에비스타(EVISTA)®), 트리옥시펜, 케옥시펜, 및 선택적 에스트로겐 수용체 조절제 (SERM), 예컨대 SERM3; 효능제 특성을 갖지 않는 순수한 항에스트로겐, 예컨대 플베스트란트 (파슬로덱스(FASLODEX)®) 및 EM800 (이러한 작용제는 에스트로겐 수용체 (ER) 이량체화를 차단하고/거나, DNA 결합을 억제하고/거나, ER 턴오버를 증가시키고/거나 ER 수준을 저해할 수 있음); 아로마타제 억제제, 예를 들어 스테로이드성 아로마타제 억제제, 예컨대 포르메스탄 및 엑세메스탄 (아로마신(AROMASIN)®), 및 비스테로이드성 아로마타제 억제제, 예컨대 아나스트라졸 (아리미덱스(ARIMIDEX)®), 레트로졸 (페마라(FEMARA)®) 및 아미노글루테티미드, 및 다른 아로마타제 억제제, 예를 들어 보로졸 (리비소르(RIVISOR)®), 메게스트롤 아세테이트 (메가세(MEGASE)®), 파드로졸 및 4(5)-이미다졸; 황체화 호르몬-방출 호르몬 효능제, 예를 들어 류프롤리드 (루프론(LUPRON)®) 및 엘리가드(ELIGARD)®, 고세렐린, 부세렐린 및 트립테렐린; 성 스테로이드, 예를 들어 프로게스틴, 예컨대 메게스트롤 아세테이트 및 메드록시프로게스테론 아세테이트, 에스트로겐, 예컨대 디에틸stil베스트롤 및 프레마린, 및 안드로겐/레티노이드, 예컨대 플루옥시메스테론, 모든 트랜스레티온산 및 펜레티니드; 오나프리스톤; 항프로게스테론; 에스트로겐 수용체 하향 조절제 (ERD); 항안드로겐,

예컨대 플루타미드, 닐루타미드 및 비칼루타미드; 및 상기 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체; 뿐만 아니라 상기 중 2종 이상의 조합물을 포함하나 이에 제한되지는 않는 호르몬 그 자체일 수 있다.

[0259] 이러한 조합 요법은 또한 하기를 포함한다: (i) 지질 키나제 억제제; (ii) 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 특히 이상 세포 증식에 관련된 신호전달 경로에서 유전자의 발현을 억제하는 것, 예를 들어 PKC-알파, Ral1 및 H-Ras; (iii) 리보자임, 예컨대 VEGF 발현 억제제 (예를 들어, 안지오자임(ANGIOZYME)® 리보자임) 및 HER2 발현 억제제; (iv) 백신, 예컨대 유전자 요법 백신, 예를 들어, 알로백틴® 백신, 류백틴® 백신 및 박시드® 백신; 프로류킨(PROLEUKIN)® rIL-2; 루르토테칸® 토포이소머라제 1 억제제; 아바렐릭스® rmRH; (v) 항혈관신생제, 예컨대 베바시주맙 (아바스틴(AVASTIN)®, 제넨테크); 및 상기 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체.

[0260] 상기 언급된 이러한 조합 요법은 조합 투여 (여기서 2종 이상의 치료제가 동일한 또는 개별 제제에 포함됨), 및 개별 투여를 포괄하고, 이 경우에 본 발명의 항-NRG1 항체의 투여는 추가의 치료제 및/또는 아주반트의 투여 전에, 그와 동시에 및/또는 그 후에 수행될 수 있다.

[0261] H. 제조품

[0262] 본 발명의 또 다른 측면에서, 상기 기재된 장애의 치료, 예방 및/또는 진단에 유용한 물질을 함유하는 제조품이 제공된다. 제조품은 용기, 및 용기 상에 있거나 용기와 결합된 라벨 또는 포장 삽입물을 포함한다. 적합한 용기는 예를 들어 병, 바이알, 시린지, IV 용액 백 등을 포함한다. 용기는 다양한 물질, 예컨대 유리 또는 플라스틱으로부터 형성될 수 있다. 용기는 조성물 자체를 수용하거나 또는 상기 조성물을 상태의 치료, 예방 및/또는 진단에 유효한 또 다른 조성물과 조합하여 수용하며, 멸균 접근 포트를 가질 수 있다 (예를 들어, 용기는 피하 주사 바늘로 뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥 주사액 백 또는 바이알일 수 있음). 조성물 내의 하나 이상의 활성제는 본 발명의 항체이다. 라벨 또는 포장 삽입물은 조성물이 선택된 상태를 치료하는데 사용된다는 것을 나타낸다. 또한, 제조품은 (a) 그 내부에, 본 발명의 항체를 포함하는 조성물을 함유하는 제1 용기; 및 (b) 그 내부에, 추가의 세포독성제 또는 다른 치료제를 포함하는 조성물을 함유하는 제2 용기를 포함할 수 있다. 본 발명의 이러한 실시양태에서의 제조품은, 조성물이 특정한 상태를 치료하기 위해 사용될 수 있음을 나타내는 포장 삽입물을 추가로 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 제조품은 제약상 허용되는 완충제, 예컨대 정박 테리아 주사용수 (BWHI), 포스페이트-완충 염수, 링거액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제2 (또는 제3) 용기를 추가로 포함할 수 있다. 이는 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘 및 시린지를 포함하여, 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질을 추가로 포함할 수 있다.

[0263] III. 실시예

[0264] 다음은 본 발명의 방법 및 조성물의 예이다. 상기 제공된 일반적 설명에 따라 다양한 다른 실시양태를 실시할 수 있는 것으로 이해된다.

[0265] 실시예 1: 방법

[0266] 세포주

[0267] NSCLC 세포주 Calu3, H441, H1299, H1993, A549 및 H596, 및 KPL4 유방암 세포주를 아메리칸 타입 컬렉션 (American Type Culture Collection) (ATCC) (버지니아주 마나사스)로부터 입수하였다. 이들 세포주를 10% FBS, Pen/Strep 및 L-글루타민을 함유하는 RPMI에서 유지하였다. Calu3을 RPMI 대신 ATCC 배지에서 배양하였다. Calu3, H441 및 KPL4 세포주를 TZV-b-액틴-eGFP 렌티바이러스로 형질도입하였다. 다중 계대배양 후에, 높은 GFP 발현 세포를 분류하고, 증폭시켜 ~95% GFP 양성 세포를 수득하고, 이들 하위-세포주를 Calu3-GFP 및 H441-GFP 및 KPL4-GFP로 기재하였다. 마우스 NSCLC 세포주 LKPH1 및 LKPH2는 Kras^{LSL-G12D/+}; p53^{FL/+}; Z/EG 폐 종양-보유 마우스로부터의 2개의 독립적인 종양으로부터 유래되었다. 세포주를 5% FBS, 소 뇌하수체 추출물, N2 보충물, EGF, FGF, Pen/Strep 및 L-글루타민을 함유하는 DMEM/F12 배지에서 확립하였다. LKPH1 및 LKPH2를 10% FBS, Pen/Strep 및 L-글루타민을 함유하는 DMEM 고-글루코스 배지에서 배양하였다.

[0268] **유도성 shRNA 렌티바이러스:** 본 연구에 사용된 헤어핀 올리고뉴클레오타이드는 다음과 같다:

shNRG1: 5'- GATCCCCCATGGTGAACATAGCGAATTTCAAGAGAA
TTCGCTATGTTCAACCATGTTTTTGGAAA-3' (센스) (서열: 77)
및
5'- AGCTTTTCC AAAAAACATGGTGAACAT AGC GAATTCTCTTGAAATTCGCTATGTTAC
CATGGGG-3' (안티센스) (서열: 78).
shNRG1.2: 5'-GATCCCCGAGTATATGTGCAAAGTGAT TCAAGAGATCAC TTTG
CACATATACTCTTTTTTGGAAA-3' (센스) (서열: 79) 및
5'-AGCTTTTCCAAAAAAGAGTATATGTGCAAAGTGATCTCTTGAATCACTTTGCA
CATATACTCGGG-3' (안티센스) (서열: 80).
shErbB4: 5'- GATCCCCGATCACAACCTGCTGCTTAATTCAAGAGATTAAGCAGCAGTTGT
GATCTTTTTTGGAAA-3' (센스) (서열: 81) 및
5' AGCTTTTCCAAAAAAGATCACAACCTGCTGCTTAATCTCTTGA ATTAAGCAGCAGTT
GTGATCGGG-3' (안티센스) (서열: 82).
shErbB3: 5'-
GATCCCCAAGAGGATGTCAACGGTTATTCAAGAGATAACCGTTGACATCCTCTTTTTTTTG
GAAA-3' (센스) (서열: 83) 및
5'-AGCTTTTCCAAAAAAGAGGATGTCAACGGTTATCTCTTGAATAACCGTT
GACATCCTCTTGGG-3' (안티센스) (서열: 84).
마우스 shNRG1: 5'- GATCCCCCATGGTGAACATAGCGAATTTCA AGAGAA
TTCGCTATGTTCAACCATGTTTTTGGAAA-3' (센스) (서열: 85) 및
5'- AGCTTTTCC AAAAAACATGGTGAACATAGC GAATTCTCTTGAAATTCG CTATGTTAC
CATGGGG-3' (안티센스) (서열: 86).

[0269]

[0270] 상보적 이중-가닥 shRNA 올리고뉴클레오타이드를 기재된 바와 같이 Tet-유도성 바이러스 유전자 전달 벡터에 삽입하였다 (Hoeflich et al. Cancer Res. 2006). 벡터 시스템은 서플 벡터, 및 Tet-조절된 shRNA 발현이 가능하도록 코돈-최적화 Tet 리프레서-내부 리보솜 진입 부위-dsRed 카세트를 함유하는 dsRed 발현 바이러스 벡터 벡본으로 구성된다. 루시페라제 shRNA 구축물은 이전에 기재되었다 (Hoeflich et al.).

[0271] **바이러스 패키징 및 세포주 생성:** 유도성-shRNA 보유 렌티바이러스 구축물은 이전에 기재된 방법에 기초하여 리포팩타민 (인비트로젠(Invitrogen), 캘리포니아주 칼스배드)을 사용하여 HEK293T 세포에서 원하는 shRNA를 함유하는 pHUSH-렌티-dsRed 구축물을 수포성 구내염 바이러스 (VSV-G) 외피 당단백질 및 HIV-1 패키징 단백질 (GAG-POL)을 발현하는 플라스미드로 공-형질감염시킴으로써 만들었다. 표적 세포를 이들 바이러스로 형질도입시켰다. >3 계대배양 후에, FACS 분류를 이용하여 상위 ~20% dsRed 발현 종양 세포를 선택하였으며, 이를 수집하고, 모으고, 확장시켰다.

[0272] **시험관내 연구:** shRNA 발현을 유도하기 위해, 독시시클린-유도성 shNRG1 또는 sh루시페라제를 보유하는 안정한 세포주를 1μg/ml 독시시클린에서 총 6일 동안 성장시켰다. 제1일의 유도 세포를 10% FBS에서 성장시킨 후에, 추가 4일의 과정에 걸쳐 FBS의 적정을 수행하였다. 이어서, 세포를 성장의 마지막 6시간 동안 완전하게 혈청 고갈시켰다. 이어서, 세포를 RNA 추출 또는 웨스턴 블롯팅을 위해 처리하였다. 마우스 폐 종양 세포주에서 HER4ECD 연구를 위해, LKPH 세포를 혈청 고갈된 조건에서 24시간 동안 성장시킨 후에 HER4ECD를 2mg/ml의 농도로 첨가하였다. 이어서, LKPH 세포를 또 다른 48시간 동안 인큐베이션한 후에 웨스턴 블롯팅을 위해 처리하였다. H441 세포 상의 외인성 NRG1의 첨가를 하기와 같이 수행하였다: H441 세포를 18시간 동안 혈청 고갈시킨 후에 1μM 재조합 인간 NRG1 베타-1 세포의 도메인 (R&D 시스템즈(R&D systems)) 또는 1μM 항-돼지폴 IgG2A를 대조군으로 첨가하였다. NRG1 또는 돼지폴 첨가 10분 후에, 세포를 웨스턴 블롯팅을 위해 처리하였다.

[0273] **RNA 분리, cDNA 제조 및 qPCR:** RNA를 퀴아젠(Qiagen) RNeasy 마이크로 키트를 이용하여 분리하였다. 상보적 DNA를 전체 RNA로부터 ABI 고충실도 키트를 제조업체의 지침에 따라 이용하여 제조하였다. NRG1알파, NRG1베타, HER3, HER4 발현을 ABI 유전자 특이적 프라이머/프로브를 사용하여 정량적 실시간 PCR (ABI 7500)에 의해 결정하였다. 유전자 발현을 GAPDH 또는 RAB14 하우스 키핑 유전자를 사용하여 정규화하였다.

- [0274] **생체내 이중이식 종양 연구:** 종양 세포 (10-20백만개)를 무흉선 누드 마우스의 오른쪽 옆구리에 이식하였다. 종양 크기가 $\sim 200 \text{ mm}^3$ 에 도달한 경우에, 마우스를 상이한 처리군으로 나누었다. 이어서, 마우스를 비히클 또는 화학요법 (파클리탁셀, i.v. + 시스플라틴, i.p.)으로 초기 연구 동안 처리하였다. 화학요법 투여 요법은 파클리탁셀 20 mg/kg i.v. 격일의 5회 투여 및 시스플라틴 5 mg/kg i.p. Calu3 모델의 경우에 제1일 및 제7일 및 H441 모델의 경우에 제1일 및 제14일이었다. 퇴행된 종양 및 시간 매치 비히클 대조군을 화학요법제를 마지막으로 투여한지 적어도 1주일 후에 수집하였다. 종양을 디스파제/콜라게나제를 이용하여 해리시키고, 샘플을 FACS 분류하여 GFP 양성 종양 세포를 수집하였다. NRG1 녹다운 연구의 경우에, 처리군은 수크로스, 독시시클린 (dox), 화학요법제 + 수크로스 및 화학요법제 + 독시시클린이었다. 수크로스 또는 독시시클린으로의 처리를 화학요법제의 첫번째 투여와 동시에 시작하였고, 연구 기간 동안 계속되었다. 5% 수크로스 물을 비히클 군에게 임의로 제공하고, 5% 수크로스 중 1 mg/ml 독시시클린을 독시시클린 군에게 제공하였다.
- [0275] **이중이식 종양 성장 분석:** 시간 경과에 따라 동일한 동물로부터의 종양 부피의 반복 측정값을 적절하게 분석하기 위해, 혼합-모델링 접근법을 이용하였다 (Pinheiro et al. 2009). 이러한 접근법은 반복 측정값 및 연구 종점 전 동물의 무처리-관련 종결로 인한 그다지 크지 않은 중도탈락률을 둘 다 다룰 수 있다. 3차 회귀 스피라인을 이용하여 비선형 프로파일을 각각의 처리군에 대한 $\log_2$ 종양 부피의 시간 경과에 피팅하였다.
- [0276] **생체내 $LSL-K-ras^{G12D};p53^{F1/+}$ 및 $LSL-K-ras^{G12D};p53^{F1/F1}$ Her4ECD 연구:** $LSL-K-ras^{G12D};p53^{F1/+}$ 를 아데노-Cre 바이러스로 감염시키고, 종양 유도후 16주 동안 숙성시켰다. 기준선 CT 스캔을 종양 유도후 제16주 (연구 제0일)에 수행하고, 마우스를 군당 평균 출발 종양 부피가 동등하도록 분류하였다. 연구 기간 동안 마우스에게 시스플라틴 (7 mg/kg) 또는 포스페이트-완충 염수를 3주 동안 1주에 1회 및 HER4ECD-Fc (25 mg/kg) 또는 항-돼지폴 IgG2A (25 mg/kg)를 2주마다 투여하였다. 연속 CT 스캔을 제14일, 제45일 및 제66일에 수행하였다.
- [0277] **X선 마이크로-컴퓨터 단층촬영 (마이크로-CT):** 2개의 마이크로-CT 시스템 (vivaCT 40 및 vivaCT 75, 스캔코 메디컬(Scanco Medical), 스위스)을 중단 폐 영상화에 이용하였다. 동물을 마이크로-CT 시스템 사이에 무작위로 분류하고, 기준선 영상화에 이용된 동일한 시스템 상에서 다시 스캔하였다. 데이터를 $38 \mu\text{m}$ (vivaCT 40) 또는 $50 \mu\text{m}$ (vivaCT 75) 등방성 복셀 크기, 1000회 투영, 250 ms (vivaCT 40) 또는 200 ms (vivaCT 75) 통합 시간, 45 keV 광자 에너지 및 177 mA 전류에서 취득하였다. 생체내 영상화 기간 동안, 동물을 메디컬 에어에서 2% 이소플루란으로 마취하고, 조절되는 따뜻한 기류에 의해 일정한 37°C 온도에서 유지하였다. 각각의 세션에 대한 영상화 시간은 동물당 대략 15분 (vivaCT 75) 또는 25분 (vivaCT 40)이었으며, 추정된 방사선 용량은 대략 0.2 Gy (vivaCT 75) 또는 0.1 Gy (vivaCT 40)였다. 영상화 데이터를 영상 분석 소프트웨어 패키지 분석 (어날라이즈다이렉트, 인크.(AnalyzeDirect, Inc.), 미국 켄자스주 레넥사)을 이용하여 관상면에서 평가하였다. 각각의 종양의 최대 횡단면이 확인되면, 최대 종양 직경 (d_1) 및 최대 수직 직경 (d_2)의 추정값을 결정하였다. 총 종양 부피를 모든 종양의 방향성 추정값의 외적 ($d_1 \times d_2$)의 합으로 계산하였다. 생체내 마이크로-CT 종양 분석은 이전에 검증되었으며, 생체의 마이크로CT 분석에 의해 결정된 바와 같이 전체 종양 부피와 잘 상관되는 것으로 밝혀졌다 (Singh et al., 2010).
- [0278] **siRNA:** HER3 (M-003127-03), HER1 (M-003114-01), HER2, HER4 및 비 표적화 대조군 (D-001206-14-20)에 대한 소형 간섭 RNA 올리고 (siRNA) 풀을 다마콘(Dharmacon, 콜로라도주 라파예트)으로부터 구입하였다. siRNA를 역형질감염에 의해 H522 세포에 도입하였다. 세포/웰을 제조업체의 제안에 따라 모은 RNAi 올리고의 예비-인큐베이션된 혼합물 (50 mmol/L) 및 OPTI-MEM (인비트로젠)에 희석된 다마펙트(DharmaFECT)# (T-2001-02, 다마콘) 역형질감염 시약을 함유하는 96 웰 마이크로타이터 플레이트에 시딩하였다. 역형질감염 96시간 후에 세포 증식에 대한 효과를 알라마르블루(AlamarBlue) 염색에 의해 측정하였다.
- [0279] **웨스턴 블롯팅:** 시험관내 세포 배양물의 웨스턴 블롯을 위해, 부착 세포를 빙냉 $1\times$ 포스페이트-완충 염수 (PBS)로 3회 세척하고, RIPA 완충제 (피어스 바이오테크놀로지), Halt 프로테아제 억제제 및 Halt 포스파타제 억제제 콕테일 (써모 사이언티픽)에 용해시켰다. 용해물을 수집하고, 균질화하고, 10분 동안 원심분리에 의해 정화하였다. 원발성 마우스 종양 용해물을 상기 언급된 바와 같이 PBS 세척하지 않고 제조하였다. 상청액 단백질을 4-12% NuPAGE 노백스(Novex) 비스-트리스 겔 (인비트로젠)에서 분획화하였다. 블롯팅을 아이블롯(iBlot) 건식 블롯팅 시스템 (인비트로젠)을 제조업체의 설명에 따라 이용하여 수행하였다. 니트로셀룰로스 막 차단 및 항체 염색은 오디세이(Odyssey) 웨스턴 블롯 분석 및 적외선 영상화 시스템 (리-코르 바이오사이언시스(Li-Cor Biosciences))을 제조업체의 지침에 따라 이용하여 수행하였다. 블롯을 오디세이 스캐너 (리-코르 바이오사이언시스) 상에서 시각화하였다.

[0280] 항체: 하기 일차 항체를 웨스턴 블롯팅 실험에 사용하였다: 항-액틴 (612656, BD 바이오사이언시스, 항-GAPDH (sc-25778, 산타 크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology)), 항-EGF 수용체 (2232, 셀 시그널링 테크놀로지(Cell Signaling Technology)), 항-Neu (sc-284, 산타 크루즈 바이오테크놀로지), 항-ErbB3 (sc-285, 산타 크루즈 바이오테크놀로지), 항-포스포-HER3 (4791, 셀 시그널링 테크놀로지), 항-ErbB4 (sc-283, 산타 크루즈 바이오테크놀로지), 항-포스포-HER4 (4757, 셀 시그널링 테크놀로지), 항-Akt (4691, 셀 시그널링 테크놀로지), 항-포스포-Akt (4058, 셀 시그널링 테크놀로지), Stat/포스포-Stat 항체 샘플러 키트 (9939/9914, 셀 시그널링 테크놀로지), 항-MEK 1/ 2 (9126, 셀 시그널링 테크놀로지), 항-포스포-MEK 1/ 2 (2338, 셀 시그널링 테크놀로지). 하기 리-코르 바이오사이언시스로부터의 이차 항체를 사용하였다: IRDye 680 접합된 염소 항-마우스 IgG, IRDye 800 CW 접합된 염소 항-토끼 IgG.

[0281] **비아코어**

[0282] 항-NRG1 IgG의 결합 친화도를 비아코어™-T100 기기를 이용하여 표면 플라즈몬 공명 (SRP)에 의해 측정하였다. 항-NRG1 인간 IgG를 CM5 바이오센서 칩 상에 코팅된 마우스 항-인간 Fc 항체 (지이 헬스케어(GE Healthcare), 카탈로그# BR-1008-39)에 의해 포획하여 대략 1000 반응 단위 (RU)를 달성하였다. 동역학적 측정을 위해, 인간 NRG1- α 및 NRG1- β 의 2배 연속 희석액 (500nM $\rightarrow$ 0.245nM)을 HBS-T 완충제 (지이 헬스케어, 카탈로그#BR-1003-68) 중에 25°C에서 30 μ l/분의 유량으로 주사하였다. 회합률 (k_{on}) 및 해리율 (k_{off})을 단순 일-대-일 랭뮤어 결합 모델 (비아코어 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 이용하여 계산하였다. 평형 해리 상수 (K_D)를 k_{off}/k_{on} 으로 계산하였다.

[0283] **KIRA**

[0284] MCF 7 세포 배양

[0285] MCF 7 세포를 96 웰 배양 플레이트 (No. 1270, BD 팔콘(BD Falcon); 뉴저지주 프랭클린 레이크스)에 10% 태아 소 혈청 (FBS) (시그마 알드리치 코퍼레이션(Sigma Aldrich Corporation); 미주리주 세인트 루이스)을 포함하는 RPMI 배지 중 5,000개 세포/웰 시딩 밀도로 첨가하였다. 플레이트를 37°C에서 3일 동안 5% CO2 중에서 배양하였다. 제3일에 MCF 7 세포를 혈청 무함유 배지로 교환하고, 세포를 계속 37°C에서 > 6시간 동안 인큐베이션한 후에 뉴레굴린 및 시험 물질을 첨가하였다.

[0286] NRG1 α 및 NRG1 β 에 의해 유도된 Her3 이중이량체 인산화의 억제

[0287] 시험 물질 (538.24.71 및 526.90.28 항체)을 0.5 % BSA, 페니실린 (100 μ /mL, 킵코(Gibco) 인비트로젠; 캘리포니아주 칼스배드), 스트렙토마이신 (100 μ g/mL, 킵코 인비트로젠), 및 L 글루타민 (10 mM, 제넨테크)을 포함하는 비-혈청 함유 RPMI 배지로 연속적으로 희석하여 총 10개의 농축물을 생성하였다. 제조합 인간 뉴레굴린 1-알파 (rhNRG1 α , R&D 시스템 카탈로그# 296-HR/CF, 미네소타주 미네아폴리스)를 비-혈청 함유 배지 (상기 기재된 바와 같음)로 제조하였다. 각각의 희석된 시험 물질을 동등한 부피의 rhNRG1 α (0.5 nM 최종 농도)와 혼합하였다. 제조합 인간 뉴레굴린 1-베타 (rhNRG1 β , 제넨테크)를 비 혈청 함유 배지 (상기 기재된 바와 같음)로 희석하였다. 각각의 희석된 시험 물질을 동등한 부피의 rhNRG1 β (0.2 nM 최종 농도)와 혼합하였다.

[0288] MCF 7 세포를 함유하는 플레이트를 인큐베이터로부터 제거하였다. 이어서, 시험 물질 및 rhNRG1 α 또는 rhNRG1 β 를 함유하는 혼합물을 각각의 웰에 첨가하였다. 세포를 15분 동안 37°C에서 5% CO2와 인큐베이션하였다. 샘플-함유 배지를 따라내고, 플레이트를 종이 타올 상에서 가볍게 두드렸다. 세포를 용해시키고 수용체를 가용화하기 위해, 희석된 세포 용해 완충제 (셀 시그널링 테크놀로지스, 카탈로그#9803), 프로테아제 억제제 각테일 세트 I, 번호 539131, 칼바이오켄(Calbiochem) 포함)을 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 교반하면서 15 내지 60분 동안 인큐베이션하여 용해를 완수하였다. 용해물을 -80°C 동결기에 저장하거나 또는 ELISA를 이용하는 인산화의 정량화를 위해 바로 사용하였다.

[0289] 키나제 수용체 활성화에 대한 ELISA

[0290] 맥시소프트 이뮤노플레이트 (4-64718, 눈크(Nunc); 뉴저지주 넵툼)를 PBS 중 항 erb3 MAb (R+D 시스템즈 듀오 세트(Duo Set) IC 포스포-ErbB3 키트 파트# 841428, 미네소타주 미네아폴리스)로 밤새 코팅하였다. 다음날, 포획 MAb를 제거하고, 플레이트를 세척 완충제 (0.05% 트윈 20을 포함하는 PBS, pH 7.4)로 세척하고, 차단 완충제 (PBS 중 0.5% BSA)로 1-2시간 동안 차단하였다. 플레이트를 세척 완충제로 세척하고, 세포 용해물 및 대조군 (R+D 시스템즈 듀오 세트 IC 포스포-ErbB3 키트 파트# 841430, 미네소타주 미네아폴리스)을 차단된 플레이트에 첨가하고, 플레이트를 실온에서 교반하면서 2시간 동안 인큐베이션하여 충분한 결합을 허용하였다. 인큐베이션

후에, 플레이트를 세척 완충제로 6회 세척하고, 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP)와 접합된 항 포스포 티로신 MAb (R+D 시스템즈 듀오 세트 IC 포스포-ErbB3 키트 파트# 841403, 미네소타주 미네아폴리스)를 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 1시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 다시 세척하고, 비색 기질 테트라메틸 벤지딘 (키르케가드 & 페리 래보러토리즈(Kirkegaard & Perry Laboratories); 메릴랜드주 게이더스버그)을 첨가하였다. 색을 20분 동안 발색시켰다. 이어서, H3PO4를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 플레이트를 마이크로플레이트 판독기 (써모 랩 시스템즈(Thermo Lab Systems); 매사추세츠주 월섬) 상에서 450 nm에서 620 nm 참조로 판독하였다. 흡광도를 그래프로 나타내고, 억제에 대해 분석하였다. 데이터를 칼레이다그래프(KaleidaGraph) 4.0 (시너지 소프트웨어(Synergy Software); 펜실베이니아주 리딩)로 전달하고, 절반 최대 억제 농도 (IC50) 값을 4 파라미터 S자형 피트를 이용하여 계산하였다.

[0291] **실시예 2 - NRG1 녹다운은 종양 성장을 억제하고, 화학요법 후의 종양 재발을 지연시킨다**

[0292] 원발성 종양 성장 및 화학요법 후의 재발에 대한 NRG1 녹다운의 효과를 단독 또는 화학요법과 조합된 NRG1 녹다운의 효과를 평가하여 결정하였다. HER 패밀리 수용체의 다양한 발현 패턴을 나타내는 3개의 인간 NSCLC 모델을 본 연구에 사용하였다. Calu3 모델은 모든 수용체의 높은 단백질 수준을 갖고, H441는 HER2 및 HER3의 강한 발현 및 중간 정도의 HER1을 나타내고, H1299는 중간 정도 수준 HER1, 2 및 3을 나타낸다.

[0293] Calu3 모델에서 NRG1-표적화의 효능을 결정하기 위해, Calu3-shNRG1 종양 보유 마우스를 4개의 군에 배정하였다; 1) 비히클 + 수크로스, 2) 비히클 + dox, 3) 화학요법 + 수크로스, 및 4) 화학요법 + dox. 파클리탁셀 (20mg/kg, i.v. 격일로 5회 투여) 및 시스플라틴 (5mg/kg, i.p. 7일마다 2회 투여) 및 5% 수크로스 또는 dox (2g/L)로 이루어진 화학요법제를 음용수 중에 임의로 경구로 투여하였다. 종양 부피는 연구 기간 동안 1주에 2회 측정하였다. 종양 성장 곡선을 연구에 사용된 개별 마우스에 대해 생성하고 (비히클+수크로스의 경우에 n=12마리 마우스 및 비히클+dox의 경우에 n=13마리 마우스), 도 1a 및 1b에 자가-결정된 노트를 갖는 3차 스플라인으로서 그래프로 나타낸 종양 부피의 선형 혼합 효과 (LME) 모델 생성된 피트로 제시하였다. 비히클 + dox 군 (배가까지의 시간 (TDT) = 44.5일) vs. 비히클 + 수크로스 (TDT = 17일)로 종양 부피 배가 시간의 유의한 지연이 있었으며, 이는 NRG1 녹다운이 종양 성장을 부분적으로 억제한다는 것을 시사한다 (도 1a).

[0294] 종양 재발에 대한 NRG1의 효과는 화학요법 + 수크로스에서의 종양 성장을 화학요법 + dox 군에서의 종양 성장과 비교하여 평가하였다. 화학요법 + dox 군 (TDT >181일, 연구 종점까지 도달하지 않음) vs. 화학요법 + 수크로스 (TDT = 124일)에서 종양 재발의 유의한 지연이 있었다 (도 1b). 또한, dox-처리된 마우스로부터의 다수의 재발된 종양은, 화학요법제의 존재 및 부재 둘 다에서, 주로 오직 작은 영역의 생존 종양 조직을 갖는 갈색/흑색 점액-유사 액체로 구성된다. 따라서, 측정된 부피는 dox-처리된 군에서 실제 종양 부피보다 상당히 더 컸다. Calu3-shLuc 대조군 연구에서 임의의 군 사이에 차이는 관찰되지 않았다. 또한, 면역조직화학 (IHC)을 화학요법제의 마지막 투여 3일 후에 Calu3 종양에 대한 증식 마커 Ki67에 대해 수행하였다. 화학요법 + 수크로스 종양에 비해 화학요법 + dox 처리된 종양에 현저하게 낮은 비율의 Ki67 양성 세포가 존재하였으며, 이는 NRG1 신호전달이 화학요법 후에 나머지 종양 세포의 증식을 자극한다는 것을 제안한다.

[0295] 초기 및 후기 시점에서 수집된 종양 세포에서 NRG1 α 및 NRG1 β 이소형의 mRNA 수준이 결정되었다. NRG1 전사체는 후기 시점에 증가하였으며, 이는 녹다운이 생체내에서 유지되지 않는다는 것을 나타낸다.

[0296] H441 이종이식편 모델에서 NRG1 녹다운의 효과를 또한 조사하였다. 원발성 종양 성장에 대해 최소 효과가 존재하였을지라도 (도 2a (n=12 /군) 자가-결정된 노트를 갖는 3차 스플라인으로서 그래프로 나타낸 종양 부피의 LME 피트 분석으로 제시된 종양 성장 곡선), 화학요법 + dox 군 (TDT >150일, 연구 종점까지 도달하지 않음) vs. 화학요법 + 수크로스 (TDT = 94일)에서 종양 재발의 유의한 지연이 있었다 (도 2b((n=12/군)). H441-shLuc 생체내 연구에서는 이러한 종양 부피의 차이가 존재하지 않았다. Calu3 이종이식편 모델과 유사하게, H441 모델은 또한 후기 시점에서 증가된 수준의 NRG1 전사체를 나타내었다.

[0297] NRG1 수준의 복구 후의 메커니즘을 조사하기 위해, 종양 세포를 렌티바이러스 형질도입된 유전자의 발현에 대해 분석하였다. 세포를 shRNA로 형질도입하는데 사용된 렌티바이러스가 또한 dsRed 마커 유전자를 포함하기 때문에, 초기 및 후기 시점에서 dsRED 양성 종양 세포의 비율을 유동 세포측정법에 의해 비교하였다. 렌티 바이러스 유전자 발현의 생체내 손실은 초기 (5일) 및 후기 시점 (>100일)에서의 종양에 대해 렌티바이러스 dsRed 트랜스진을 발현하는 종양 세포 (인간 특이적-ESA 양성)의 비율을 조사하는 FACS 분석에 의해 평가하였다. 초기 시점의 마우스는 수크로스 또는 dox를 제공받았고, 후기 시점의 마우스는 화학요법제+수크로스 또는 화학요법제+dox를 제공받았다. 수크로스 및 dox 처리된 종양 둘 다에서 후기 시점에 dsRed 양성 세포 비율의 유의한 감소가 관찰되었으며, 감소는 dox 처리된 종양에서 유의하게 더 컸다 (1.8배 vs. 4.1배, p=0.007). 이는 바이러스

트랜스진 발현의 손실이 NRG1 수준의 복구와 상관된다는 것을 시사한다.

[0298] Calu3 및 H441 세포 둘 다 증가된 수준의 HER3 단백질을 보여주며, 종양 재발에서 NRG1의 역할이 수용체 과다 발현을 갖는 종양에 특이적인지 여부에 대한 의문이 제기되었다. 이러한 의문을 다루기 위해, 훨씬 낮은 수준의 HER3을 갖는 H1299 이중이식편 모델을 이용하였다. NRG1 단독의 녹다운은 H441 모델과 유사하게 오직 원발성 종양 성장에 대해서만 그다지 크지 않은 효과를 나타내었다. 대조적으로 H1299 종양의 매우 공격적인 성장에도 불구하고, NRG1 녹다운은 화학요법 결과에 대한 증진된 반응 및 화학요법 + dox 군 (TDT = 30.45일) vs. 화학요법 + 수크로스 (TDT = 11.5일) (n=12/군)에서 종양 재발의 유의한 지연으로 이어졌다.

[0299] 또한, NRG1 mRNA 수준의 보다 그다지 크지 않은 감소를 발생시키는 NRG1에 대한 상이한 shRNA (shNRG1.2)를 발현하는 H1299의 안정한 하위세포주를 생성하였다. H1299-shNRG1.2를 사용하는 생체내 연구는 또한 NRG1 녹다운시에 화학요법에 대한 증진된 반응을 입증하였다. 그러나, 성장 억제 정도는 이 모델에서 더 작았으며, 이는 보다 적은 정도의 NRG1 녹다운과 일치한다. H1299-shLuc 생체내 연구에서 화학요법제의 존재 또는 부재 하에 수크로스 및 dox 처리된 군 사이에 종양 부피의 차이는 존재하지 않았다.

[0300] shRNA 매개된 녹다운에 의한 NRG1 자가분비 신호전달의 억제는 원발성 종양 성장에 대해 오직 그다지 크지 않은 내지 중간 정도의 효과를 나타내었으나, 화학요법 후의 종양 재발을 현저하게 지연시켰다. 이중이식편 모델에서 NRG1의 장기 녹다운을 유지하지 못함에도 불구하고, 본 발명자들은 NRG1 녹다운시에 종양 재발의 유의한 지연을 관찰하였다. 이러한 발견은 원발성 종양 성장, 및 화학요법내성 및 재발을 조절하는 중요 경로에 차이가 존재한다는 것을 시사한다.

[0301] **실시예 3 - NRG1 신호전달의 억제는 종양 재발을 지연시킨다**

[0302] $LSL-K-ras^{G12D};p53^{F1/+}$ 마우스 모델에서 화학요법 후의 재발을 촉진하는 NRG1 신호전달의 역할을 시험하기 위해, NRG1을 격리하여 생체내에서 수용체에 대한 그의 결합을 방지하는 리간드-트랩 접근법을 이용하였다. 무린 IgG2A Fc에 융합된 인간 HER4 세포외 도메인 (HER4-ECD)을 생성하였다. HER4는 NRG1에 대한 고친화도 결합을 보여준다 (Tzahar et al., 1994). HER4-ECD를 시험관내에서 혈청 고갈된 LKPH1 및 LKPH2 세포에 첨가하였을 경우에, 감소된 p-HER3 수준에 의해 입증된 바와 같이 NRG1/HER3 신호전달의 억제가 관찰되었다. 따라서, 시험관내에서 분자는 예상된 바와 같이 자가분비-매개된 NRG1 신호전달을 방해하는 행동을 한다.

[0303] 폐 종양 보유 $LSL-K-ras^{G12D};p53^{F1/+}$ 마우스를 연구 시작시 (제0일)에 X선 마이크로-컴퓨터 단층촬영 (마이크로-CT)에 의해 영상화하고, 동등한 출발 종양 부담을 갖는 3개의 군으로 분류하고, 하기와 같이 처리하였다: 1) PBS + 대조군 IgG2A; 2) 시스플라틴 + 대조군 IgG2A; 및 3) 시스플라틴 + HER4-ECD. 종양 부담의 변화를 측정하기 위해 마우스에게 종단 마이크로-CT 스캔을 적용하였다. 평균 종양 부담 (도 3a (평균 종양 부피 +/- SEM을 나타내는 그래프, 돼지풀, 대조군 무린 IgG2a 항체)) 및 종양 성장률 ((도 3b (95% 신뢰 구간을 갖는 치료요법에 의한 종양 부담의 일일 변화 배수를 보여주는 그래프))의 분석은 오직 시스플라틴 + HER4-ECD의 조합이 종양 성장의 유의한 감소를 발생시키고 시스플라틴 단독은 그렇지 않다는 것을 보여주었다. 시스플라틴 처리된 마우스가 화학요법 후 첫번째 마이크로-CT 스캔에서 그의 종양 성장의 정체를 나타내었을지라도, 연구 종결시의 평균 종양 부담 및 전반적 종양 성장률은 비히클 및 시스플라틴 처리된 군 사이에서 유의하게 상이하지 않았다 (도 3a-b).

[0304] 제2 연구는 상기 기재된 바와 같이 $LSL-K-ras^{G12D};p53^{F1/F1}$ 마우스에서 수행하였다. 그러나, 이 연구는 상기 기재된 군 뿐만 아니라 HER4-ECD 단일 작용제 아암을 포함하였다. 제28일에 마이크로-CT에 의한 종양 부담의 분석은 시스플라틴 + 비히클 처리된 마우스 및 모든 다른 군에 비해 시스플라틴 + HER4-ECD 처리된 마우스에서 종양 부담의 유의한 감소를 보여주었다 (도 3c). 대조적으로, HER4-ECD 처리 단독은 종양 성장에 대해 영향을 미치지 않았으며, 이는 추가로 화학요법내성 및/또는 종양 재성장에서 NRG1 자가분비 신호전달에 대한 고유의 역할을 뒷받침한다. 이 연구에서, $LSL-K-ras^{G12D};p53^{F1/F1}$ 마우스를 비히클 + 대조군 IgG (n=10), 시스플라틴 + 대조군 IgG (n=11), 시스플라틴 + HER4-ECD (n=8) 또는 비히클 + HER4-ECD (n=7)로 처리하였다. 도 3c의 그래프는 기준선으로부터의 종양 부담의 평균 변화 퍼센트 ± SEM을 나타낸다. 던넛(Dunnett) 다중 비교 검정을 이용하여 모든 처리군을 비히클 대조군에 대해 비교하였다 (** p = 0.0016). 조합 활성을 언페어드 t-검정을 이용하여 그의 단독요법에 대해 평가하였다 (* p < 0.05, ** p < 0.01).

[0305] **실시예 4 - NRG1은 화학요법에서 생존한 나머지 종양 세포에서 풍부화된다**

[0306] Z/EG Cre-수용체 품종 (Novak et al., 2000)과 교배된 NSCLC의 $LSL-K-ras^{G12D}$ 유전자 조작된 마우스 모델

(GEMM) (Jackson et al., 2001)을 이용하여 TRIC 집단을 특성화하였다. LSL-K-rasG12D 마우스의 시스플라틴 처리는 종양 부담의 감소를 발생시켰으나 연장된 생존을 발생시키지는 않았으며, 이는 종양이 요법 후에 다시 성장한다는 것을 나타낸다 (Oliver et al., 2010). 또한, 종양이 시스플라틴 + 파클리탁셀 이중 화학요법에 반응하여 퇴행되었으나, 치료를 중단한지 몇 주 후에 다시 성장하는 2개의 인간 이종이식편 모델을 이용하였다. Calu3 및 H441 인간 NSCLC 이종이식편 모델의 GFP-발현 하위세포주를 생성하여 형광 활성화 세포 분류 (FACS)에 의한 종양 세포의 단리를 허용하였다. 각각의 모델에서, 종양 재성장의 개시 전에 화학요법에서 생존한 GFP-양성 세포가 TRIC 집단을 함유하였으므로 이들을 단리하였다.

[0307] LSL-K-rasG12D 마우스 모델에서 TRIC를 분석하였다. 시스플라틴의 최종 투여 1주 후에 폐를 수집하고, GFP 양성 종양 세포를 FACS에 의해 단리하였다. 비히클 처리된 및 나머지 종양 세포의 유전자 발현 프로파일의 차이를 특성화하기 위해, RNA를 종양 세포로부터 단리하고 (PI- & GFP+), 발현 프로파일링을 수행하였다. 어레이 상의 모든 유전자 중에서 NRG1이 나머지 화학요법제-처리된 종양 세포에서 가장 통계적으로 유의한 풍부화 - 13.7배 풍부화 ($p < 0.001$, $q = 1$; $n = 6$ /군)를 보여주었다. 독립적으로 생성된 샘플에 대한 정량적 실시간 PCR (qPCR)은 마이크로어레이 결과를 검증하였다 (도 4A).

[0308] Calu3 및 H441 이종이식편 모델로부터 단리된 TRIC에서 NRG1의 발현을 분석하였다. 대안적 스플라이싱으로 인해 수용체 결합에 요구되는 NRG1 EGF-유사 도메인의 2개의 활성 이소형이 존재하며, 이들은 NRG1 α 및 NRG1 β 로 지칭된다. NRG1 α 및 NRG1 β 의 발현은 이들 모델로부터의 나머지 화학요법제-처리된 종양 세포에서 유의하게 풍부하였다. Calu3 종양 모델은 NRG1 α 의 경우에 4.7배 풍부화 ($p = 0.02$) 및 NRG1 β 의 경우에 3.4배 풍부화 ($p = 0.04$)를 보여주었다. (도 4B). H441 종양 모델은 NRG1 α 의 경우에 11.4배 풍부화 ($p = 0.02$) 및 NRG1 β 의 경우에 12.1배 풍부화 ($p = 0.04$)를 보여주었다. (도 4C). 흥미롭게도, HER3 또는 HER4 수용체 발현이 모든 모델에서 일관되게 풍부화되지 않았다.

[0309] Calu3 및 H441 이종이식편 모델로부터 단리된 TRIC에서 NRG1 발현은 통상적으로 NSCLC를 치료하는데 사용된다. 겐시타빈을 사용한 치료는 각각의 이들 모델에서 종양 퇴행을 발생시켰으며, 나머지 종양 세포는 NRG1에 대해 매우 풍부화되었다. Calu3 종양 모델은 NRG1에 대해 52.5배 풍부화를 보여주었다 ($p = 0.011$). H441 종양 모델은 NRG1에 대해 11.7배 풍부화를 보여주었다 ($p = 0.025$) (도 4D). 그러나, Calu3 및 H441 종양은 비노렐빈을 사용한 치료시에 계속 성장하였고, 치료는 NRG1의 풍부화를 발생시키지 않았다.

[0310] NRG1 단백질 수준 및 NRG1 수용체, HER3의 활성화를 또한 웨스턴 블롯을 통해 평가하였다. NRG1 단백질 수준 및 포스포-Her3 수준이 비히클 처리된 종양 세포에서 보다 나머지 종양 세포에서 일관되게 더 높은 것으로 결정되었다. HER3의 활성화를 포스포-HER3에 대한 종양의 면역염색에 의해 조사하였다. 나머지 종양에서 대부분의 종양 세포는 p-HER3 양성인 반면 비히클 처리된 종양은 단지 p-HER3 양성 세포이 산재된 클러스터만을 보여주었다. 따라서, 나머지 종양 세포는 NRG1을 발현하고 증진된 수용체 활성화를 나타내었으며, 이는 증가된 NRG1 자가분비 신호전달을 입증한다.

[0311] 실시예 5 - NSCLC에서의 NRG1 수용체 용법

[0312] 어떤 HER 수용체가 NSCLC에서 NRG1 자가분비 신호전달에 사용되는지 이해하기 위해, 종양 세포 증식에 대한 HER3 및 HER4 녹다운의 효과를 평가하였다. Calu3 NSCLC 모델은 다른 세포주에 비해 높은 수준의 모든 HER 패밀리 수용체를 발현하였다. 안정한 dox-유도성 shHER3 (Calu3-shHER3) 및 shHER4 (Calu3-shHER4) Calu3 세포 하위세포주 뿐만 아니라 dox-유도성 shRNA를 루시페라제로 전달하는 대조군 세포주를 생성하였다. HER3 및 HER4 전사체 수준은 qPCR에 의해 측정된 바와 같이 dox (2 μ g/ml)의 존재 하에 각각 Calu3-shHER3 및 Calu3-shHER4에서 감소하였으며, 이는 웨스턴 블롯에 의해 측정된 바와 같이 감소된 단백질 수준을 발생시켰다. 흥미롭게도, dox의 존재 하에 Calu3-shHER3에서 관찰된 p-AKT 하향-조절의 정도는 Calu3-shHER4에서 관찰된 것보다 훨씬 더 컸으며, 이는 HER3이 Calu3 모델에서 NRG1 자가분비 신호전달을 매개하는 우세한 수용체임을 시사한다.

[0313] 생체내에서 이러한 역할을 확인하기 위해, 수크로스 또는 dox로 처리된 Calu3-shHER3 및 Calu3-shHER4 이종이식편 모델을 이용하는 연구를 수행하였다. 확립된 Calu3-shHER3 또는 Calu3-shHER4 이종이식 종양을 갖는 마우스에게 그의 음용수 중 비히클 (수크로스) 또는 dox (2gm/L)를 임의로 투여하였다 ($n = 14$ /군). 수크로스 치료를 받은 마우스 (TDT = 11일)에 비해 dox 치료를 받은 마우스 (TDT = 19일)에서 Calu3-shHER3 종양 성장의 실질적인 억제가 존재하였다. 그러나, Calu3-shHER4 생체내 연구에서 종양 성장의 주목할만한 억제는 존재하지 않았다.

[0314] 시험관내 수용체 분석 및 생체내 연구는 높은 HER4 수준에도 불구하고, NRG1 자가분비 신호전달이 이 모델에서

주로 HER3을 통해 발생한다는 것을 나타낸다.

[0315] NRG1 자가분비 신호전달을 높은 수준의 HER4를 발현하나 검출가능한 HER3을 발현하지 않는 H522 인간 NSCLC 세포주에서 평가하였다. H522-shNRG1 하위세포주를 생성하였다. 혈청 고갈된 H522-shNRG1 세포에 대한 dox의 투여는 감소된 수준의 포스포-HER4 및 포스포-S6을 발생시켰다. H522-shLuc 대조군 세포에서 차이가 관찰되지 않았다. siRNA-매개된 녹다운을 이용하여 세포 집단에서 각각의 HER 패밀리 구성원에 대한 필요를 시험하였다. 오직 HER4의 녹다운이 감소된 세포 증식을 발생시켰으며 다른 HER 패밀리 수용체는 그렇지 않았다. 이러한 데이터는 NRG1 자가분비 신호전달이 H522 세포에서 HER4를 통해 일어났음을 시사한다. 따라서, NSCLC에서 NRG1 자가분비 신호전달은 HER3 및 HER4 둘 다에 의해 매개될 수 있다.

[0316] 실시예 6 - 항-NRG1 항체의 생성

[0317] 항-NRG1 항체를 확인하기 위한 라이브러리 분류 및 스크리닝

[0318] 재조합 인간 NRG1- α EGF 도메인 (R&D 시스템즈, 카탈로그# 296-HR/CF) (서열 3) 및 NRG1- β ECD 도메인 (R&D 시스템즈, 카탈로그# 377-HB/CF) (서열 4)을 라이브러리 분류에서 항원으로 사용하였다. 도 5. 눈크 96 웰 맥시소프트 이뮤노플레이트를 밤새 4°C에서 표적 항원 (10 μ g/ml)으로 코팅하고, 1시간 동안 실온에서 파지 차단 완충제 PBST (포스페이트-완충 염수 (PBS) 및 1% (w/v) 소 혈청 알부민 (BSA) 및 0.05% (v/v) 트윈-20)로 차단하였다. 항체 파지 라이브러리 (Lee et al., J. Mol. Biol. 340, 1073-1093, 2004, Liang et al., JMB. 366: 815-829, 2007)를 개별적으로 항원 플레이트에 첨가하고, 밤새 실온에서 인큐베이션하였다. 다음날 항원-코팅된 플레이트를 PBT (0.05% 트윈-20을 포함하는 PBS)로 10회 세척하고, 결합된 파지를 50mM HCl 및 500mM NaCl로 30분 동안 용리하고, 등등한 부피의 1 M 트리스 염기 (pH7.5)로 중화시켰다. 회수된 파지를 이. 콜라이 XL-1 블루 세포에서 증폭시켰다. 이후의 선별 라운드 동안, 항체 파지의 항원-코팅된 플레이트와의 인큐베이션을 2-3시간으로 감소시켰고, 플레이트 세척의 엄격도를 점차 증가시켰다.

[0319] 5개 라운드의 패닝 후에, 유의한 풍부화가 관찰되었다. 1000개의 클론을 라이브러리 분류로부터 피킹하여 이들이 인간 NRG1-알파 및 NRG1-베타 둘 다에 특이적으로 결합하지는 여부를 결정하였다. 이들 클론의 가변 영역을 서열분석하여 고유한 서열 클론을 확인하였다.

[0320] 스폿 경쟁 ELISA를 이용하여 파지 항체의 친화도를 평가하였다. 파지 상청액을 75nM NRG1-알파의 존재 또는 부재 하에 100 μ l 전체 부피로 ELISA (효소 결합 면역흡착 검정) 완충제 (0.5% BSA, 0.05% 트윈20을 포함하는 PBS) 중에서 1:5 희석하고, F 플레이트 (눈크) 중에서 적어도 1시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 표적 단백질의 존재 또는 부재 하의 95 μ l의 혼합물을 표적 단백질 코팅된 플레이트 (밤새 1 μ g/ml NRG1-알파 코팅됨)에 나란히 전달하였다. 플레이트를 15분 동안 부드럽게 진탕시켜 표적 단백질-코팅된 플레이트에 결합하지 않은 파지를 포획하였다. 플레이트를 PBS-0.05% 트윈 20으로 10회 세척하였다. 결합을 ELISA 완충제 중 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP)-접합된 항-M13 항체 (1:5000)를 첨가하여 정량화하고, 30분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBS-0.05% 트윈 20으로 10회 세척하였다. 다음에, 웰에 1:1 비의 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 (TMB) 퍼옥시다제 기질 및 퍼옥시다제 용액 B (H₂O₂) (키르케가드페리-레보리토리즈 (메릴랜드주 게이더스버그))를 100 μ l/웰로 첨가하고, 5분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 100 μ l 0.1M 인산 (H₃PO₄)을 각각의 웰에 첨가하여 반응을 중지시키고, 5분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 각각의 웰에서 황색의 OD (광학 밀도)를 450 nm에서 표준 ELISA 플레이트 판독기를 이용하여 결정하였다. OD 감소 (%)를 하기 식으로 계산하였다.

[0321] OD_{450nm} 감소 (%) = [(경쟁자를 갖는 웰의 OD_{450nm}) / (경쟁자를 갖지 않는 웰의 OD_{450nm})]*100

[0322] NRG1- α 표적에 대해 30%보다 낮은 OD_{450nm} 감소 (%)를 갖는 클론을 피킹하고, 개별 클론의 V_L 및 V_H 영역을 각각 LPG3 및 LPG4 벡터에 클로닝하여 전장 인간 IgG1로 재구성하였다. 이후에 이들 클론을 포유동물 CHO 세포에서 일시적으로 발현시키고, 단백질을 A 칼럼으로 정제하였다.

[0323] 기능적 항체의 선택

[0324] 항체를 이들이 HER3-Fc에 대한 NRG1 β 결합을 억제하는 능력에 대해 시험하였다. 125I-HRG를 이전에 기재된 바와 같이 제넨테크에서 제조하였다 (Sliwowski et al. JBC 1994). 결합 검정을 눈크 개별 스트립 웰 (써모-피셔 사이언티픽(Thermo-Fisher Scientific), 뉴욕주 로체스터)에서 수행하였다. 플레이트를 카르보네이트 완충제 (pH 9.6) 중 250 ng/웰의 HER3-ECD-Fc 용합 단백질로 밤새 4°C에서 코팅하였다. 플레이트를 세척 완충제 (PBS/0.05% 트윈 20)로 2회 세척하고, 1% 소 혈청 알부민 (BSA)을 포함하는 100 μ L PBS로 30분 동안 차단하였다. 0.2% BSA를 포함하는 RPMI 1640 배지 (인비트로젠; 캘리포니아주 칼스배드) 중 증가하는 농도의 항-NRG1

항체를 HER3-ECD-Fc에 다시 결합시켰다. 바로 후에 125I-HRG (비활성: 266 mCi/mg, 75,000 cpm/웰)를 130 μ L의 총 검정 부피로 첨가하였다. 플레이트를 2시간 동안 실온에서 인큐베이션하고, 2회 세정하고, 개별 웰을 100 시리즈 이소 테이터 γ -카운터를 이용하여 카운팅하였다. 샘플을 3회 검정하였다. 칼레이다그래프 3.6 소프트웨어를 이용하여 플롯팅을 수행하였다. 도 6에 나타난 데이터는 시험된 모 항-NRG1 항체의 하위세트에 의한 NRG β 의 용량-의존성 억제력을 보여주며, 526.02, 538.24 및 526.90은 가장 강력한 차단제로 나타났다. (본원의 일부 위치에서와 같은 이러한 클론 및 그의 친화도 성숙 변이체는 수치 식별자 앞에 "YW"를 사용하여 식별함.)

[0325] 항체의 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열을 결정하였다. 도 25, 도 26, 도 27, 및 도 28.

[0326] **실시예 7 - 항-NRG1 항체의 친화도 성숙**

[0327] 선택된 항-NRG1 항체를 친화도 성숙시켰다. 모 및 친화도 성숙 변이체의 아미노산 서열을 도 25, 도 26, 도 27 및 도 28에 나타내었다.

[0328] V_H 또는 V_HV_L 라이브러리로부터 유래된 클론의 친화도 개선을 위한 라이브러리의 구축

[0329] 파지미드 pW0703 (파지미드 pV0350-2b (문헌 [Lee et al., J. Mol. Biol. 340, 1073-1093 (2004)])로부터 유래됨, 모든 CDR-L3 위치에 정지 코돈 (TAA)을 함유하고, M13 박테리오파지의 표면 상에 1가 Fab를 디스플레이함)를 친화도 성숙을 위한 V_H 라이브러리로부터의 관심 클론의 중쇄 가변 도메인 (V_H) 이식에 사용하기 위한 라이브러리 주형으로 제공하였다. 하드 및 소프트 랜덤화 전략이 둘 다 친화도 성숙에 이용되었다. 하드 랜덤화의 경우에, 3개의 경쇄 CDR의 선택된 위치를 갖는 1개의 경쇄 라이브러리를 천연 인간 항체를 모방하도록 설계된 아미노산을 이용하여 랜덤화하고, 설계된 DNA 축중성은 문헌 [Lee et al. (J. Mol. Biol. 340, 1073-1093 (2004))]에 기재된 바와 같다. 선택된 위치에서 대략 50%의 돌연변이율을 도입하는 소프트 랜덤화 조건을 달성하기 위해, 돌연변이유발 DNA를 야생형 뉴클레오타이드를 선호하는 염기의 70-10-10-10 혼합물을 사용하여 합성하였다 (문헌 [Gallop et al., Journal of Medicinal Chemistry 37:1233-1251 (1994)]). 소프트 랜덤화를 위해, CDR-L3의 위치 91-96, CDR-H1의 30-33, 35, CDR-H2의 50, 52, 53-54 및 56, CDR-H3의 95-98에서의 잔기를 표적화하였고; CDR 루프의 2개의 상이한 조합, H1/H3/L3, H2/L3 및 H3/L3을 랜덤화를 위해 선택하였다.

[0330] V_HV_L 라이브러리 기원의 클론의 경우에, 각각의 CDR에 4개의 정지 코돈 (TAA)을 함유하고 M13 박테리오파지의 표면 상에 1가 Fab를 디스플레이하는 파지미드를 개별적으로 생성하고, 친화도 성숙 라이브러리의 구축을 위한 쿼터 돌연변이유발에 사용하기 위한 주형으로 제공하였다. CDR-L3의 다양성이 나이브 라이브러리로 구축되었으므로 V_HV_L 라이브러리로부터 유래된 클론의 경우에는 오직 소프트 랜덤화 전략을 이용하였다. 소프트 랜덤화 조건을 달성하기 위해, CDR-L1의 위치 28-31, CDR-L2의 50, 53-55, CDR-L3의 91-96, CDR-H1의 30-35, CDR-H2의 50-56, CDR-H3의 95-100에서의 잔기를 표적화하였고; CDR 루프의 10개의 상이한 조합, H1*/H3, H1*/H2, H2*/L3, H3*, H3*/L2, L1*/L2, L1*/L3, H3/L3*, L2/L3* 및 H1/L3* (여기서 *는 주형 상의 정지 코돈의 위치를 표시함)를 랜덤화를 위해 선택하였다.

[0331] 친화도 개선을 생성하기 위한 파지 분류 전략

[0332] 친화도 개선 선택을 위해, NRG1-베타 또는 NRG1-알파를 우선 제한 시약 조건 하에 비오틀화시키고, 역상 크로마토그래피를 수행하여 모노-비오틀화-종을 수득하였다. 파지 라이브러리에 증가하는 엄격도를 이용하는 6개 라운드의 용액 분류에 적용하였다. 용액 분류의 제1 라운드의 경우에, 1% BSA 및 0.05% 트윈 20 중 3 O.D./ml의 파지 투입물을 NRG1-알파 또는 NRG1-베타로 3시간 동안 예비-코팅된 플레이트에 인큐베이션하였다. 웰을 PBS-0.05% 트윈 20으로 10회 세척하였다. 결합된 파지를 150 μ L/웰 50mM HCl, 500mM KCl로 30분 동안 용리하고, 이후에 50 μ L/웰의 1M 트리스 pH8에 의해 중화시키고, 적정하고, 다음 라운드를 위해 증폭시켰다. 이후의 라운드에서, 파지 라이브러리의 패닝을 용액 상에서 수행하였으며, 여기서 파지 라이브러리를 1% 슈퍼블록 (Superblock) (피어스 바이오테크놀로지) 및 0.05% 트윈20을 함유하는 100 μ L 완충제 중 100 nM 비오틀화 표적 단백질 (농도는 모 클론 파지 IC50 값에 기초함)과 2시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 혼합물을 1% 슈퍼블록으로 추가로 10X 희석하고, 100 μ L/웰을 30분 동안 실온에서 부드럽게 진탕시키면서 뉴트라비딘-코팅된 웰 (10 μ g/ml)에 적용하였다. 배경 결합을 결정하기 위해, 파지를 함유하는 대조군 웰을 뉴트라비딘-코팅된 플레이트 상에 포획하였다. 이어서, 결합된 파지를 세척하고, 용리하고, 제1 라운드에서 기재된 바와 같이 증폭시켰다. 추가의 5개 라운드의 용액 분류를 증가하는 선택 엄격도와 함께 수행하였다. 이들 중 제1 커플 라운드는 비오틀화 표적 단백질 농도를 100nM으로부터 0.1nM까지 낮춤으로써 온-레이트 선별을 위한 것이고, 이들

중 마지막 2개의 라운드는 과량의 비-비오틴화 표적 단백질 (300 내지 1000배 초과)을 첨가하여 실온에서 보다 약한 결합제와 경쟁시키는 오프-레이트 선별을 위한 것이다.

[0333] 고처리량 친화도 스크리닝 ELISA (단일 스폿 경쟁)

[0334] 콜로니를 제6 라운드의 스크리닝으로부터 피킹하였다. 콜로니를 96-웰 플레이트 (팔콘(Falcon))에서 50 µg/ml 카르바미실린 및 1×10^{10} /ml M13K07을 갖는 150 µl/웰의 2YT 배지 중에서 밤새 37°C에서 성장시켰다. 동일한 플레이트로부터, XL-1 감염된 모 파지의 콜로니를 대조군으로 피킹하였다. 96-웰 눈크 맥시소프 플레이트를 PBS 중 100 µl/웰의 NRG1-알파 또는 NRG1-베타 (0.5 µg/ml)로 4°C에서 밤새 코팅하였다. 플레이트를 PBS 20 중 150 µl의 1% BSA 및 0.05% 트윈으로 1시간 동안 차단하였다.

[0335] 35µl의 파지 상청액을 5nM NRG1-알파 또는 NRG1-베타의 존재 또는 부재 하에 75µl의 ELISA (효소 결합 면역흡착 검정) 완충제 (0.5% BSA, 0.05% 트윈20을 포함하는 PBS)로 희석하고, F 플레이트 (눈크)에서 1시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 95 µl의 혼합물을 항원 코팅된 플레이트에 나란히 전달하였다. 플레이트를 15분 동안 부드럽게 진탕시키고, PBS-0.05% 트윈 20으로 10회 세척하였다. 결합을 ELISA 완충제 (1:2500) 중 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP)-접합된 항-M13 항체를 첨가함으로써 정량화하고, 30분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBS-0.05% 트윈 20으로 10회 세척하였다. 다음에, 100 µl/웰의 퍼옥시다제 기질을 웰에 첨가하고, 5분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 100 µl 0.1M 인산 (H_3PO_4)을 각각의 웰에 첨가하여 반응을 중지시키고, 5분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 각각의 웰에서 황색의 O.D. (광학 밀도)를 450 nm에서 표준 ELISA 플레이트 판독기를 이용하여 결정하였다. 모 파지의 웰의 OD_{450nm} 감소 (%) (100%)와 비교하여, 50% 미만의 OD_{450nm} 감소 (%)를 갖는 클론을 서열 분석을 위해 피킹하였다. 특유의 클론을 파지 제조를 위해 선택하여, NRG1-알파 및 NRG1-베타 둘 다에 대한 결합 친화도 (파지 IC50)를 모 클론과 비교함으로써 결정하였다. 이어서, 가장 친화도-개선된 클론을 항체 생산 및 추가의 비아코어 결합 동역학적 분석 및 다른 시험관내 또는 생체내 검정을 위해 인간 IgG1로 재구성하였다.

[0336] **실시예 8 - 친화도 성숙 538.24 항-NRG1 항체의 특성화**

[0337] 친화도 성숙 변이체를 이들이 HER3-Fc에 대한 HRGβ 결합을 차단하는 능력에 대해 시험하였다. 125I-HRG를 이전에 기재된 바와 같이 체네테크에서 제조하였다 (Sliwowski et al. JBC 1994). 결합 검정을 눈크 개별 스트립웰 (썬도-피셔 사이언티픽, 뉴욕주 로체스터)에서 수행하였다. 플레이트를 카르보네이트 완충제 (pH 9.6) 중 250 ng/웰의 HER3-ECD-Fc 융합 단백질로 밤새 4°C에서 코팅하였다. 플레이트를 세척 완충제 (PBS/0.05% 트윈 20)로 2회 세척하고, 1% 소 혈청 알부민 (BSA)을 포함하는 100 µL PBS로 30분 동안 차단하였다. 0.2% BSA를 포함하는 RPMI 1640 배지 (인비트로젠; 캘리포니아주 칼스배드) 중 증가하는 농도의 항-NRG1 항체를 HER3-ECD-Fc에 예비-결합시켰다. 바로 후에 125I-HRG (비활성: 266 mCi/mg, 75,000 cpm/웰)를 130 µL의 총 검정 부피로 첨가하였다. 플레이트를 2시간 동안 실온에서 인큐베이션하고, 2회 세척하고, 개별 웰을 100 시리즈 이소테이터 γ-카운터를 이용하여 카운팅하였다. 샘플을 3회 검정하였다. 플롯팅을 칼레이다그래프 3.6 소프트웨어를 이용하여 수행하였다.

[0338] 도 7에 나타난 데이터는 538.24 항체의 여러 친화도 성숙 클론에 의한, Her3에 대한 125I-NRG1β 결합의 용량-의존성 억제를 보여준다. 538.24.38을 제외한 모든 것이 나노몰 아래 범위의 IC50 값으로 결합을 차단하는데 매우 효과적이다.

[0339] NRG1α 및 NRG1β에 대한 538.24 친화도 성숙 변이체 항-NRG1 IgG의 결합 친화도를 실시예 1에 기재된 바와 같이 비아코어™-T100 기기를 이용하여 표면 플라즈몬 공명 (SRP)에 의해 측정하였다. 125 nM NRG1β를 사용한 데이터를 도 8에 나타내고, 250 nM NRG1α를 사용한 데이터를 도 9에 나타낸다.

[0340] 추가의 친화도 분석을 항체 538.24.71 상에서 6.25 nM NRG1β 또는 6.25 nM NRG1β를 사용하고, 항체 538.24.94 상에서 7.8 nM NRG1β 또는 7.8 nM NRG1β를 사용하여 수행하였다. 결과를 도 10 (538.24.71) 및 도 11 (538.24.94)에 나타낸다.

[0341] **실시예 9 - 526.09 및 526.02 항-NRG1 항체 및 그의 친화도 성숙 변이체의 특성화**

[0342] 경쟁 검정을 수행하여 526.09 및 526.02 항체의 결합 특이성을 결정하였다. 도 12에 나타난 바와 같이, 526.90은 HRG1α 및 HRG1β 둘 다에 대해 538.24.17과 경쟁하며, 이는 526.90이 이들 HRG1 이소형 둘 다에 결합한다는 것을 나타낸다.

- [0343] 526.09 항체의 여러 친화도 성숙 변이체를 실시예 7에 기재된 바와 같이 제조하고, 실시예 1에 상세하게 기재된 바와 같이 KIRA 검정에서 이들이 항-HER3 항체에 대한 NRG1 α 및 NRG1 β 결합을 차단하는 능력에 대해 분석하였다. 간략하게, 혈청-고갈된 MCF-7 세포를 고정된 양의 뉴레글린 1-알파 또는 뉴레글린-베타 및 증가하는 양의 시험 물질 (YW538.24.71 및 YW526.90.28)로 15분 동안 CO2 인큐베이터에서 처리하였다. 배지를 따라낸 후에, 세포를 용해시키고, 이전에 기재된 ELISA로 분석하였다 (Sadick et al. 1999). 항-HER3을 포획 Mab (R+D 시스템즈 듀오 세트 IC 포스포-ErbB3 키트 파트# 841428, 미네소타주 미네아폴리스)로서 사용하고 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP)와 결합된 항-포스포티로신 Mab를 검출용 (R+D 시스템즈 듀오 세트 IC 포스포-ErbB3 키트 파트# 841403, 미네소타주 미네아폴리스)으로 사용하여 Her3 인산화를 측정하였다. 비색 기질의 첨가 후에, 플레이트를 마이크로플레이트 판독기 (써모 랩 시스템즈; 매사추세츠주 윌섬) 상에서 620 nm 참조로 450 nm에서 판독하였다. 흡광도를 그래프로 나타내고, 억제에 대해 분석하였다. 이들 검정의 조합된 결과를 도 13에 나타낸다.
- [0344] 친화도-성숙된 변이체를 또한 BV 시험을 이용하여 시험하고, 결과를 도 14에 나타내었다.
- [0345] NRG1 α 및 NRG1 β 에 대한 526.90.28 항-NRG1 항체의 결합 친화도를 실시예 1에 기재된 바와 같이 비아코어™-T100 기기를 이용하여 표면 플라즈몬 공명 (SRP)에 의해 측정하였다. 6.25 nM NRG1 β 및 6.25 nM NRG1 α 를 사용한 데이터를 도 15에 나타낸다.
- [0346] **실시예 10 - 항-NRG1 항체는 Her3 인산화를 억제한다**
- [0347] 항-NRG1 항체가 외인성 NRG1 리간드로의 자극에 반응하여 Her3 인산화를 억제하는 능력을 실시예 1 및 9에 기재된 바와 같이 KIRA 검정을 이용하여 시험하였다. YW538.24.71 및 YW526.90.28은 둘 다 NRG1 α 자극에 반응하여 Her3 활성화를 유사한 IC50 (각각 14 + 2.8 nM 및 13.9 + 4.8 nM)으로 억제하였다 (도 16). 그러나, YW538.24.71은 YW526.90.28보다 훨씬 강력한 NRG1 β 유도된 Her3 활성화의 차단제였다 (각각 IC50 0.12 + 0.017 및 1.44 + 0.5 nM) (도 17).
- [0348] **실시예 11 - 항-NRG1 항체는 뉴레글린에 특이적이다**
- [0349] 항체 특이성을 확인하기 위해, 관련 EGF 패밀리 리간드, EGF, HB-EGF 및 베타셀룰린 (BTC)에 대한 항체의 결합을 평가하였다. ELISA에 의해 검정되는 경우에 YW538.24.71 및 YW526.90.28에 대한 이들 리간드의 검출가능한 결합이 존재하지 않았다.
- [0350] NRG1, HB-EGF 및 BTC는 또한 HER4 수용체에 대한 리간드이다. 따라서, YW538.24.71 및 YW526.90.28이 BTC 및 HB-EGF-유도된 HER4 인산화를 억제하는 능력을 세포-기반 검정에서 분석하였다. YW538.24.71은 NRG1-B 유도된 인산화를 잠재적으로 억제하는 한편, 이는 웨스턴 블롯 분석에 의해 측정시에 BTC 또는 HB-EGF 유도된 인산화에 영향을 미치지 않았다.
- [0351] **실시예 12 - 항-NRG1 항체는 NRG1 자가분비 신호전달을 억제한다**
- [0352] 항-NRG1 항체가 NRG1 자가분비 신호전달을 억제하는 능력을 결정하였다.
- [0353] 세포를 48시간 동안 0.1%FBS + 지시된 바와 같은 항체를 함유하는 배지에서 성장시켰다. 세포를 1x PBS로 3회 세척하고, 프로테아제 및 포스포타제 억제제를 함유하는 RIPA 완충제로 용해시켰다. 용해물을 수집하고, 웨스턴 블롯팅을 위해 처리하였다.
- [0354] 데이터는 포스포-Her3 및 포스포-AKT 수준의 용량-의존성 감소에 의해 나타난 바와 같이 항-NRG1 항체 YW538.24.71이 인간 및 마우스 세포 둘 다에서 NRG1 자가분비 신호전달을 억제한다는 것을 보여준다. 도 18.
- [0355] **실시예 13 - 항-NRG1 항체는 HNSCC 종양 성장을 억제한다**
- [0356] 항-NRG1 항체가 두경부 편평세포 암종 (HNSCC)에 대한 마우스 모델 시스템에서 종양 성장을 억제하는 능력을 결정하였다. C.B-17 SCID 마우스의 오른쪽 옆구리에 5백만개 종양 HNSCC FADU 세포를 피하로 접종하였다. 종양이 150-250 mm³의 평균에 도달하였을 경우에, 동물을 동등한 평균 출발 종양 부피를 갖는 치료군으로 분류하였다. 군을 지시된 항체 및 용량, IP 투여, qwk x4로 처리하였다. 종양을 연구 기간 동안 1주에 적어도 1회 측정하였다. 도 19에 나타난 결과는 예시적인 항-NRG1 항체가 둘 다 HNSCC 종양 성장을 억제한다는 것을 보여준다.
- [0357] **실시예 14 - 항-NRG1 항체는 폐암 종양 성장을 억제한다**
- [0358] 항-NRG1 항체가 폐암에 대한 마우스 모델 시스템에서 종양 성장을 억제하는 능력을 결정하였다. 무흉선 누드

마우스의 오른쪽 옆구리에 15백만개 인간 폐 선암종 세포주 Calu3 세포를 피하로 접종하였다. 종양이 150-250 mm³의 평균에 도달하였을 경우에, 동물을 동등한 평균 출발 종양 부피를 갖는 처리군으로 분류하였다. 동물을 다음과 같이 처리하였다:

- [0359] 군 1: 비히클 (항체 완충제/카르보플라틴 완충제), i.p. qwk X 2 + 파클리탁셀 완충제, IV q2d X 5
- [0360] 군 2: 538.24.71, 25 mg/kg, IP, 연구 기간 동안 qwk + 카르보플라틴 완충제, IP qwk X 2 + 파클리탁셀 완충제, IV q2d X 5
- [0361] 군 3: 526.90.28, 25 mg/kg, IP 연구 기간 동안 qwk + 카르보플라틴 완충제, IP qwk X 2 + 파클리탁셀 완충제, IV q2d X 5.
- [0362] 군 4: 카르보플라틴, 60 mg/kg, IP qwk X 2 + 파클리탁셀, 20mg/kg, IV q2d X 5 .
- [0363] 군 5: 538.24.71, 25 mg/kg, IP 연구 기간 동안 qwk + 카르보플라틴, 60 mg/kg, IP qwk X + 파클리탁셀, 20mg/kg, IV q2d X 5.
- [0364] 군 6: 526.90.28, 25 mg/kg, IP, 연구 기간 동안 qwk + 카르보플라틴, 60 mg/kg, IP qwk X + 파클리탁셀, 20mg/kg, IV q2d X 5.
- [0365] 종양 성장 곡선은 자가-결정된 노트를 갖는 3차 스플라인으로서 그래프로 나타낸 종양 부피의 선형 혼합 효과 (LME) 모델 생성된 핏으로 제시된다. 무진행 생존을 보여주는 카플란-마이어 곡선 (진행은 종양이 그의 출발 부피의 2배에 도달한 것으로 정의됨)이 또한 제시된다. P 값을 게한-브레슬로우-윌콕슨(Gehan-Breslow-Wilcoxon) 검정에 의해 계산하였다. 도 20.
- [0366] 데이터는 단일 작용제 항-NRG1 처리가 종양 성장을 유의하게 억제한다는 것을 보여준다. 또한, 항-NRG1 처리는 치유 화학요법의 표준에 대한 반응의 지속기간을 늘려 종양 재성장을 지연시킨다.
- [0367] **실시예 15 - 항-NRG1 항체는 NSCLC 종양 성장을 억제한다**
- [0368] 항-NRG1 항체가 비소세포 폐암 (NSCLC)에 대한 마우스 모델 시스템에서 종양 성장을 억제하는 능력을 결정하였다. 무흉선 누드 마우스의 오른쪽 옆구리에 a) 20백만개 H596 세포 또는 b) 2백만개 LKPH2 세포를 피하로 접종하였다. 종양이 150-250mm³의 평균에 도달하였을 때, 동물을 동등한 평균 출발 종양 부피를 갖는 처리군으로 분류하였다. 동물을 하기와 같이 처리하였다:
- [0369] 군 1: 비히클: 항-폐지폴, 20mg/kg, IP 연구 기간 동안 qwk + 카르보플라틴 완충제, IP q4d X 5 + 파클리탁셀 완충제, IV q4d x 5.
- [0370] 군 2: Y538.24.71: Y538.24.71, 20mg/kg, IP 연구 기간 동안 qwk + 카르보플라틴 완충제, IP q4d X 5 + 파클리탁셀 완충제, IV q4d X 5.
- [0371] 군 3: 화학요법제 + 폐지폴: 항-폐지폴, 20mg/kg, IP 연구 기간 동안 qwk + 카르보플라틴, 60 mg/kg IP q4d X 5 + 파클리탁셀 20mg/kg, IV q4d x 5.
- [0372] 군 4: 화학요법제+538.24.71: 538.24.71, 20mg/kg, IP 연구 기간 동안 qwk + 카르보플라틴, 60 mg/kg IP q4d X 5 + 파클리탁셀 20mg/kg, IV q4d x 5.
- [0373] 종양 성장 곡선 및 카플란-마이어 곡선이 실시예 15에 기재된 바와 같이 생성되었다. 도 21 및 22.
- [0374] 데이터는 항-NRG1 처리가 화학요법 단독에 반응하여 퇴행되지 않는 NSCLC 모델에서 화학요법에 대한 반응의 정도를 증진시킨다는 것을 보여준다. 이러한 화학요법과의 상승작용은 심지어 H596 연구에서 나타난 바와 같이 종양 성장에 대한 단일 작용제 항-NRG1 처리의 효과가 존재하지 않은 경우에도 일어날 수 있다.
- [0375] 추가로, YW538.24.71은 또한 겐시타빈 처리, NSCLC를 치료하기 위해 통상적으로 사용되는 또 다른 화학요법제에 대한 LKPH2 종양의 반응을 증진시켰다 (도 23). 이 연구에서, 겐시타빈 (100 mg/kg)을 4회 용량을 4일마다 마우스에게 투여하였다. 종양 성장 곡선 및 카플란-마이어 곡선이 실시예 15에서와 같이 생성되었다.
- [0376] **실시예 16 - 항-NRG1 항체는 유방암 종양 성장을 억제한다**
- [0377] 항-NRG1 항체가 유방암에 대한 마우스 모델에서 시스템에서 종양 성장을 억제하는 능력을 결정하였다. MDA-MB-175T 종양 단편을 베이지색 누드 마우스의 유방 지방 패드로 이식하였다. 0.36 mg 에스트로겐 펠릿을 종양 이식 1-3일 전에 이식하였다. 종양이 150 및 250 mm³의 평균에 도달하였을 경우에 마우스를 분류하여 하기와 같

이 처리하였다:

- [0378] 군 1: 비히클 (PBS), IP, 1x/주 x 4, n=8-10
- [0379] 군 2: 항-HER3 항체, 50 mg/kg, IP, 1x/주 x 4, n=8-10
- [0380] 군 3: 538.24.71, 25 mg/kg, IP, qwk x 4, n=8-10
- [0381] 전체 주입 부피 (처리일당)는 300 μ l/마우스를 초과하지 않을 것이다.
- [0382] 1:1 HBSS:매트리젤 용액 중 NCI-H522 세포를 오른쪽 옆구리에 피하로 주입하였다. 종양이 250-350 mm³의 평균에 도달하였을 경우에, 마우스를 분류하여 하기와 같이 처리하였다:
- [0383] 군 1: 비히클 (PBS), IP, 1x/주 x 4주, n=8-10
- [0384] 군 2: 페르투주맵, 25 mg/kg, IP, 1x/주 x 4주, n=8-10
- [0385] 군 3: HER4:1462, 25 mg/kg, IP, 1x/주 x 4주, n=8-10
- [0386] 군 4: 526.90.28, 25 mg/kg, IP, 1x/주 x 4주, n=8-10
- [0387] 군 5: 538.24.71, 25 mg/kg, IP, 1x/주 x 4주, n=8-10
- [0388] 종양을 1주에 적어도 1회 측정하고, 동물을 연구 기간 동안 1주에 적어도 2회 모니터링하였다. 종양 부위를 필요에 따라 면도하여 종양 측정을 용이하게 하였다.
- [0389] 종양 성장 곡선은 자가-결정된 노트를 갖는 3차 스플라인으로서 그래프로 나타낸 종양 부피의 선형 혼합 효과 (LME) 모델 생성된 핏으로 제시된다. 종양 성장 곡선 및 카플란-마이어 곡선이 실시예 15에서와 같이 생성된다. % TGI는 모든 처리군이 여전히 제시된 일부 동물을 갖는 날들에 대해서만 핏팅된 곡선에 기초하여 대조군과 비교한 AUC/일 (본래 mm³ 부피 스케일 상의) 감소 백분율이다. 도 24.
- [0390] 이러한 데이터는 항-NRG1 Ab를 사용한 단일 작용제 치료가 NRG1 자가분비 신호전달에 의해 구동된 종양의 성장을 유의하게 억제한다는 것을 보여준다. MDA-MB-175 모델에서 종양 성장 억제는 항-NRG1이 HER3 수용체에 의해 매개되는 NRG1 신호전달에 의해 구동된 종양 성장을 억제하는 능력을 입증하는 반면 (도 24a), Her3을 발현하지 않는 H522 모델에서의 성장 억제는 항-NRG1이 NRG1-HER4 신호전달에 의해 구동된 종양의 성장을 억제하는 능력을 입증한다 (도 24b).

[0391] [표 A] 서열 목록 설명표

서열	설명
서열 1	뉴레쿨린 1 알파
서열 2	뉴레쿨린 1 베타
서열 3	뉴레쿨린 1 알파 -EGF 도메인
서열 4	뉴레쿨린 1 베타 -EGF 도메인
서열 5	HVR H1 538.24 모든 친화도 성숙 변이체에서도 동일함
서열 6	HVR H2 538.24 모든 친화도 성숙 변이체에서도 동일함
서열 7	HVR H3 538.24 모든 친화도 성숙 변이체에서도 동일함
서열 8	HVR L1 538.24; 538.24.17; 538.24.38
서열 9	HVR L2 538.24; 538.24.17; 538.24.38
서열 10	HVR L3 538.24
서열 11	HVR L3 538.24.17
서열 12	HVR L1 538.24.36
서열 13	HVR L2 538.24.36
서열 14	HVR L3 538.24.36
서열 15	HVR L3 538.24.38
서열 16	HVR L1 538.24.71
서열 17	HVR L2 538.24.71; 538.24.94
서열 18	HVR L3 538.24.71
서열 19	HVR L1 538.24.94

[0392]

서열	설명
서열 20	HVR L3 538.24.94
서열 21	중쇄 가변 영역 538.24 모든 친화도 성숙 변이체에서도 동일함
서열 22	경쇄 가변 영역 538.24
서열 23	경쇄 가변 영역 538.24.17
서열 24	경쇄 가변 영역 538.24.36
서열 25	경쇄 가변 영역 538.24.38
서열 26	경쇄 가변 영역 538.24.71
서열 27	경쇄 가변 영역 538.24.94
서열 28	HVR H1 526.90; 526.90.59; 526.90.75; 526.90.86 526.90.89
서열 29	HVR H2 526.90 모든 친화도 성숙 변이체에서도 동일함
서열 30	HVR H3 526.90; 526.90.07; 526.90.13; 526.90.15; 526.90.17; 526.90.75
서열 31	HVR L1 526.90 모든 친화도 성숙 변이체에서도 동일함
서열 32	HVR L2 526.90; 526.90.07; 526.90.13; 526.90.15; 526.90.17; 526.90.26; 526.90.28; 526.90.59; 526.90.89
서열 33	HVR L3 526.90; 526.90.26; 526.90.28; 526.90.86
서열 34	HVR H1 526.90.07; 526.90.13
서열 35	HVR L3 526.90.07
서열 36	HVR L3 526.90.13
서열 37	HVR H1 526.90.15
서열 38	HVR L3 526.90.15

[0393]

서열	설명
서열 39	HVR H1 526.90.17
서열 40	HVR L3 526.90.17
서열 41	HVR H1 526.90.26
서열 42	HVR H3 526.90.26
서열 43	HVR H3 526.90.28
서열 44	HVR H3 526.90.59
서열 45	HVR L3 526.90.59
서열 46	HVR L2 526.90.75
서열 47	HVR L3 526.90.75
서열 48	HVR H3 526.90.86
서열 49	HVR L2 526.90.86
서열 50	HVR H3 526.90.89
서열 51	HVR L3 526.90.89
서열 52	중쇄 가변 영역 526.90
서열 53	경쇄 가변 영역 526.90; 526.90.26; 526.90.28
서열 54	중쇄 가변 영역 526.90.07
서열 55	경쇄 가변 영역 526.90.07
서열 56	중쇄 가변 영역 526.90.13
서열 57	경쇄 가변 영역 526.90.13
서열 58	중쇄 가변 영역 526.90.15
서열 59	경쇄 가변 영역 526.90.15
서열 60	중쇄 가변 영역 526.90.17
서열 61	경쇄 가변 영역 526.90.17
서열 62	중쇄 가변 영역 526.90.26

[0394]

서열	설명
서열 63	중쇄 가변 영역 526.90.28
서열 64	중쇄 가변 영역 526.90.59
서열 65	경쇄 가변 영역 526.90.59
서열 66	중쇄 가변 영역 526.90.75
서열 67	경쇄 가변 영역 526.90.75
서열 68	중쇄 가변 영역 526.90.86
서열 69	경쇄 가변 영역 526.90.86
서열 70	중쇄 가변 영역 526.90.89
서열 71	경쇄 가변 영역 526.90.89
서열 72	중쇄 538.24.71
서열 73	경쇄 538.24.71
서열 74	중쇄 526.90.28
서열 75	경쇄 526.90.28
서열 76	HVR H1 526.90.28
서열 77	shNRG1 센스 올리고뉴클레오타이드
서열 78	shNRG1 안티센스 올리고뉴클레오타이드
서열 79	shNRG1.2 센스 올리고뉴클레오타이드
서열 80	shNRG1.2 안티센스 올리고뉴클레오타이드
서열 81	shErbB4 센스 올리고뉴클레오타이드
서열 82	shErbB4 안티센스 올리고뉴클레오타이드
서열 83	shErbB3 센스 올리고뉴클레오타이드
서열 84	shErbB3 안티센스 올리고뉴클레오타이드
서열 85	마우스 shNRG1 센스 올리고뉴클레오타이드
서열 86	마우스 shNRG1 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0395]

[0396]

상기 본 발명이 이해를 명확하게 하고자 하는 목적으로 예시 및 실시예로서 어느 정도 상세하게 기재되었지만, 상기 설명 및 실시예가 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본원에 인용된 모든 특허 및 과학 문헌의 개시내용은 그의 전문이 명백하게 참조로 포함된다.

[0397] 참고문헌

- 1) Lung Cancer Principles and Practice, Third edn (2005) (Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins).
- 2) Agus, D. B., *et al.* (2002). Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth. *Cancer cell* 2, 127-137.
- 3) al Moustafa, A. E., *et al.* (1999). Expression of P185erbB-2, P160erbB-3, P180erbB-4, and heregulin alpha in human normal bronchial epithelial and lung cancer cell lines. *Anticancer Res* 19, 481-486.
- 4) Baldi, P., and Long, A. D. (2001). A Bayesian framework for the analysis of microarray expression data: regularized t -test and statistical inferences of gene changes. *Bioinformatics* 17, 509-519.
- 5) Bao, S., *et al.* (2006). Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer research* 66, 7843-7848.
- 6) Brennan, S. K., and Matsui, W. (2009). Cancer stem cells: controversies in multiple myeloma. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 87, 1079-1085.
- 7) Carey, K. D., *et al.* (2006). Kinetic analysis of epidermal growth factor receptor somatic mutant proteins shows increased sensitivity to the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, erlotinib. *Cancer research* 66, 8163-8171.
- 8) Costello, R. T., *et al.* (2000). Human acute myeloid leukemia CD34+/CD38- progenitor cells have decreased sensitivity to chemotherapy and Fas-induced apoptosis, reduced immunogenicity, and impaired dendritic cell transformation capacities. *Cancer research* 60, 4403-4411.
- 9) Dahabreh, I. J., *et al.* (2010). Somatic EGFR mutation and gene copy gain as predictive biomarkers for response to tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 16, 291-303.

[0398]

- 10) Dean, M., Fojo, T., and Bates, S. (2005). Tumour stem cells and drug resistance. *Nature reviews* 5, 275-284.
- 11) Ding, L., *et al.* (2008). Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* 455, 1069-1075.
- 12) Doebele, R. C., *et al.* (2010). New strategies to overcome limitations of reversible EGFR tyrosine kinase inhibitor therapy in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 69, 1-12.
- 13) Dylla, S. J., *et al.* (2008). Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. *PloS one* 3, e2428.
- 14) Goffin, J., *et al.* (2010). First-line systemic chemotherapy in the treatment of advanced non-small cell lung cancer: a systematic review. *J Thorac Oncol* 5, 260-274.
- 15) Gollamudi, M., *et al.* (2004). Autocrine activation of ErbB2/ErbB3 receptor complex by NRG-1 in non-small cell lung cancer cell lines. *Lung Cancer* 43, 135-143.
- 16) Gray, D. C., *et al.* (2007). pHUSH: a single vector system for conditional gene expression. *BMC Biotechnol* 7, 61.
- 17) Hirsch, F. R., *et al.* (2007). Combination of EGFR gene copy number and protein expression predicts outcome for advanced non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. *Ann Oncol* 18, 752-760.
- 18) Hirsch and Wu (2007). *Expert Reviews*, Vol. 7, 147-157.
- 19) Holmes, W. E., *et al.* (1992). Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2. *Science* (New York, NY 256, 1205-1210.
- 20) Horner MJ, *et al* (eds) SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006. In, (National Cancer Institute. Bethesda, MD).
- 21) Jackson, E. L., *et al.* (2001). Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes Dev* 15, 3243-3248.
- 22) Johnson, B. E., and Janne, P. A. (2006). Rationale for a phase II trial of pertuzumab, a HER-2 dimerization inhibitor, in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 12, 4436s-4440s.
- 23) Junttila, T. T., *et al.* (2009). Ligand-independent HER2/HER3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by the PI3K inhibitor GDC-0941. *Cancer cell* 15, 429-440.
- 24) Kosaka, T., *et al.* (2004). Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications. *Cancer research* 64, 8919-8923.

[0399]

- 25) Kuyama, S., *et al.* (2008). Impact of HER2 gene and protein status on the treatment outcome of cisplatin-based chemoradiotherapy for locally advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 3, 477-482.
- 26) Lee-Hoeflich et al., (2008). A central role for HER3 in HER2-amplified breast cancer: implications for targeted therapy, *Cancer Res.* 68 , pp. 5878-5887
- 27) Li, Q., *et al.* (2004). Development of an autocrine neuregulin signaling loop with malignant transformation of human breast epithelial cells. *Cancer research* 64, 7078-7085.
- 28) Liu, L. Z., *et al.* (2007). AKT1 amplification regulates cisplatin resistance in human lung cancer cells through the mammalian target of rapamycin/p70S6K1 pathway. *Cancer research* 67, 6325-6332.
- 29) Lynch, T. J., *et al.* (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 350, 2129-2139.
- 30) Marchetti, A., *et al.* (2005). EGFR mutations in non-small-cell lung cancer: analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment. *J Clin Oncol* 23, 857-865.
- 31) Matsui, W., *et al.* (2004). Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood* 103, 2332-2336.
- 32) Novak, A., *et al.* Z/EG, a double reporter mouse line that expresses enhanced green fluorescent protein upon Cre-mediated excision. *Genesis* 28, 147-155.
- 33) Oliver, T. G., *et al.* (2010). Chronic cisplatin treatment promotes enhanced damage repair and tumor progression in a mouse model of lung cancer. *Genes Dev* 24, 837-852.
- 34) Paez, J. G., *et al.* (2004). EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science (New York, NY)* 304, 1497-1500.
- 35) Pao, W., *et al.* (2005). Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med* 2, e73.
- 36) Patel, N. V., *et al.* (2000). Neuregulin-1 and human epidermal growth factor receptors 2 and 3 play a role in human lung development in vitro. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 22, 432-440.
- 37) Phillips, T. M., *et al.* (2006). The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *Journal of the National Cancer Institute* 98, 1777-1785.

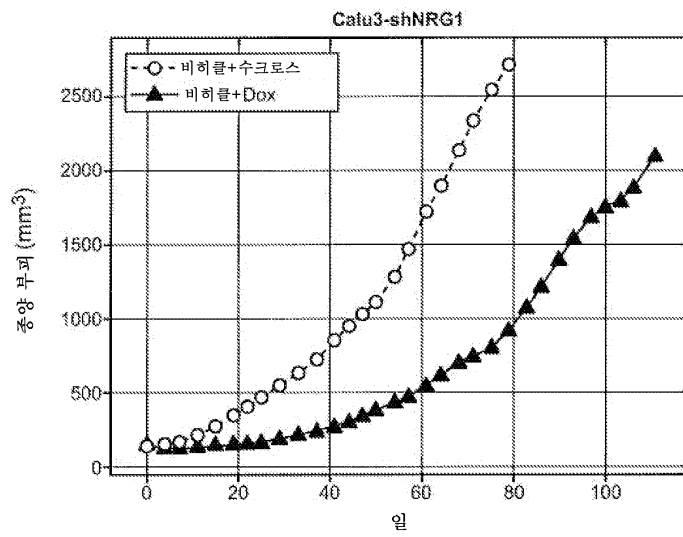
[0400]

- 38) Reissmann, P. T., *et al.* (1999). Amplification and overexpression of the cyclin D1 and epidermal growth factor receptor genes in non-small-cell lung cancer. Lung Cancer Study Group. *J Cancer Res Clin Oncol* 125, 61-70.
- 39) Schaefer, G., *et al.* (1997). Gamma-heregulin: a novel heregulin isoform that is an autocrine growth factor for the human breast cancer cell line, MDA-MB-175. *Oncogene* 15, 1385-1394.
- 40) Sheng, Q., *et al.* (2010). An Activated ErbB3/NRG1 Autocrine Loop Supports In Vivo Proliferation in Ovarian Cancer Cells. *Cancer cell* 17, 298-310.
- 41) Shi, D., *et al.* (1992). Overexpression of the c-erbB-2/neu-encoded p185 protein in primary lung cancer. *Mol Carcinog* 5, 213-218.
- 42) Shigematsu, H., Lin, L., *et al.* (2005). Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *Journal of the National Cancer Institute* 97, 339-346.
- 43) Singh, M., Lima, *et al.* (2010). Assessing therapeutic responses in Kras mutant cancers using genetically engineered mouse models. *Nat Biotechnol* 28, 585-593.
- 44) Sinnberg, T., *et al.* (2009). Inhibition of PI3K-AKT-mTOR signaling sensitizes melanoma cells to cisplatin and temozolomide. *J Invest Dermatol* 129, 1500-1515.
- 45) Storey, J. D., and Tibshirani, R. (2003). Statistical significance for genomewide studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 9440-9445.
- 46) Tzahar, E., *et al.* (1994). ErbB-3 and ErbB-4 function as the respective low and high affinity receptors of all Neu differentiation factor/hergulin isoforms. *J Biol Chem* 269, 25226-25233.
- 47) Weiner, D. B., *et al.* (1990). Expression of the neu gene-encoded protein (P185neu) in human non-small cell carcinomas of the lung. *Cancer research* 50, 421-425.
- 48) Yarden, Y., and Peles, E. (1991). Biochemical analysis of the ligand for the neu oncogenic receptor. *Biochemistry* 30, 3543-3550.
- 49) Yuste, L., *et al.* (2005). Activation of ErbB2 by overexpression or by transmembrane neuregulin results in differential signaling and sensitivity to herceptin. *Cancer research* 65, 6801-6810.
- 50) Zhou, B. B., *et al.* (2006). Targeting ADAM-mediated ligand cleavage to inhibit HER3 and EGFR pathways in non-small cell lung cancer. *Cancer cell* 10, 39-50.

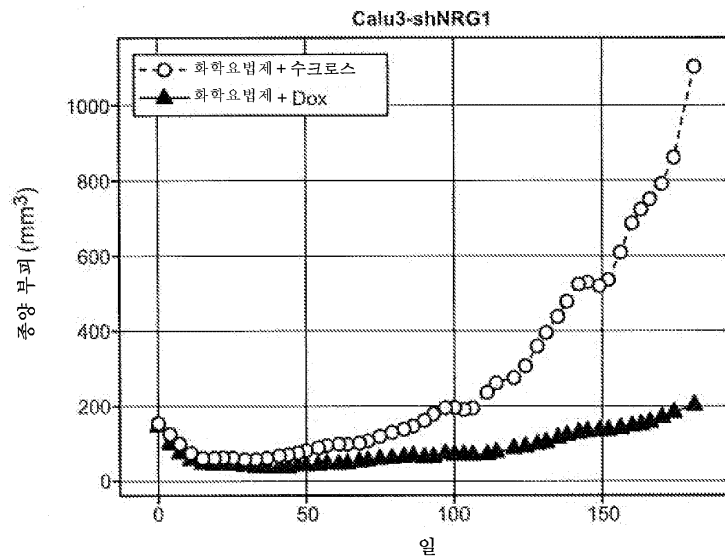
[0401]

도면

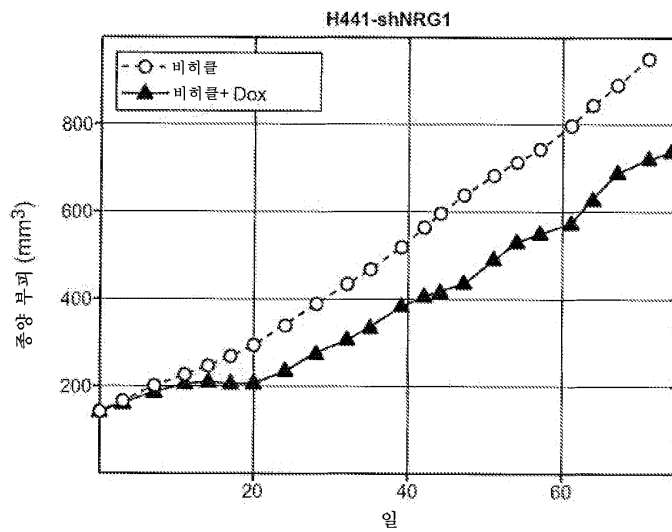
도면1a



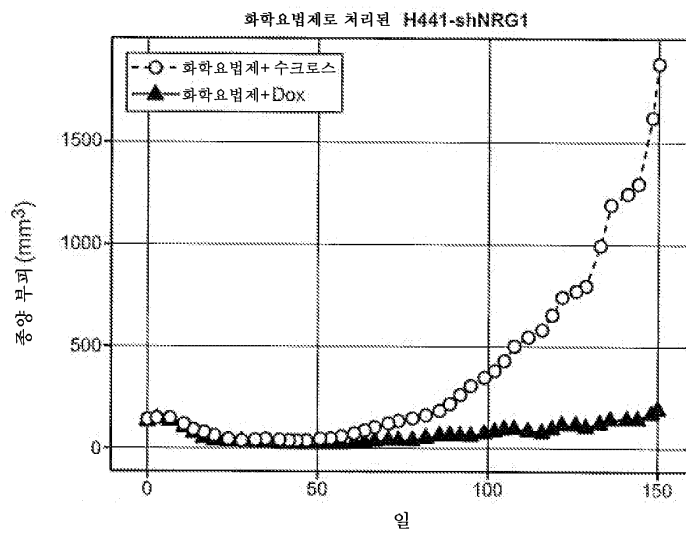
도면1b



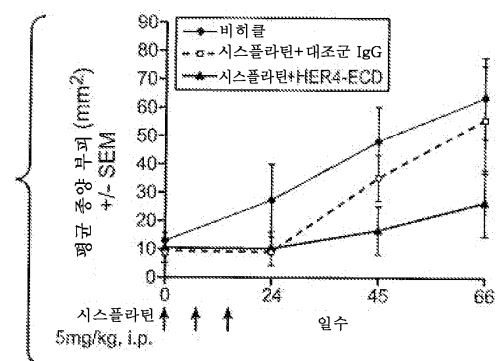
도면2a



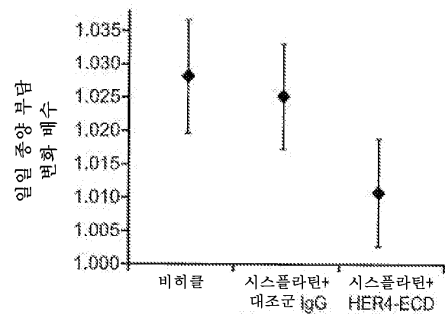
도면2b



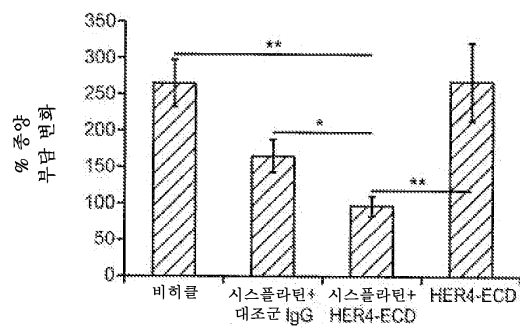
도면3a



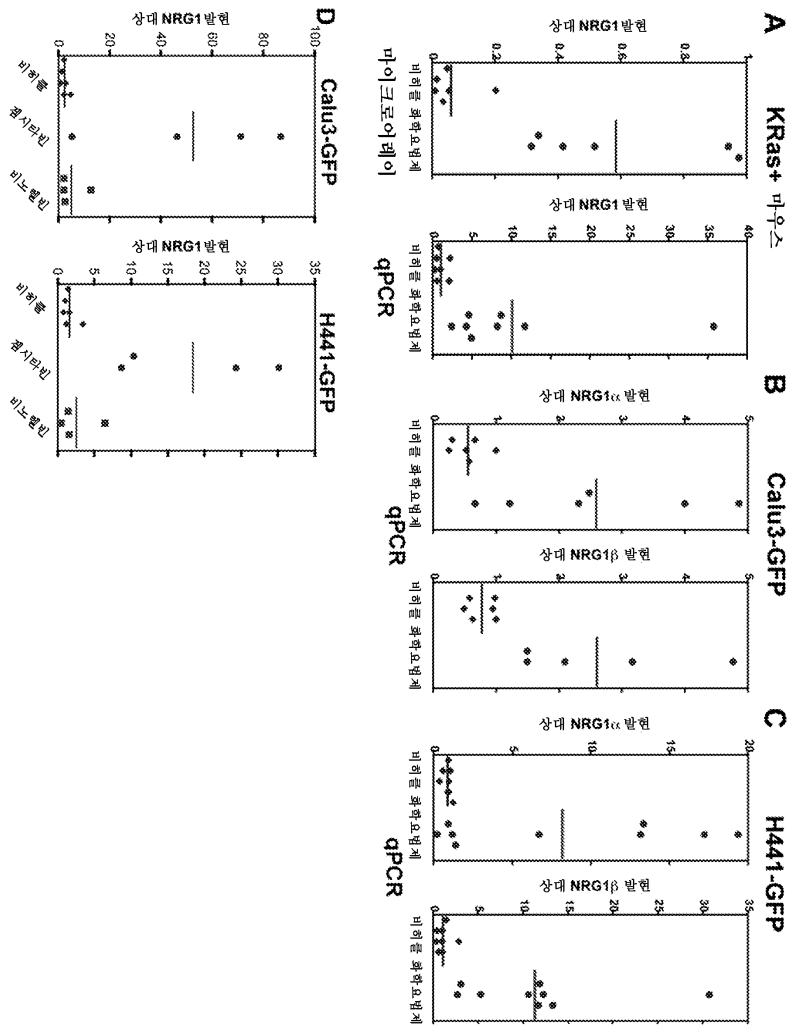
도면3b



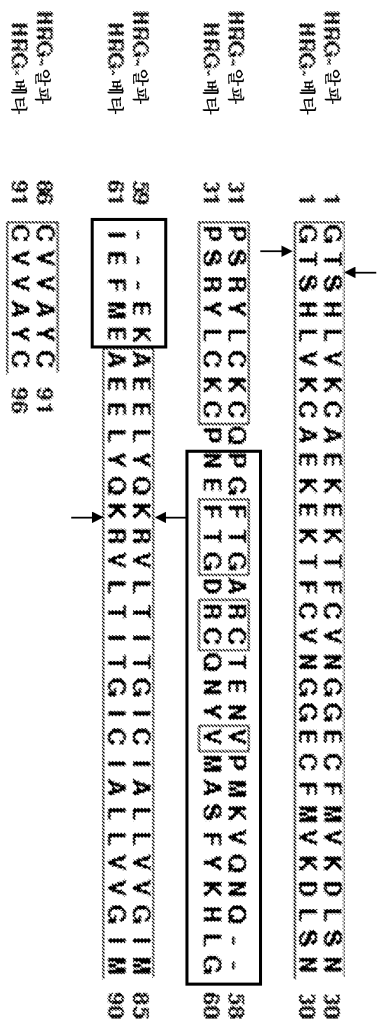
도면3c



도면4

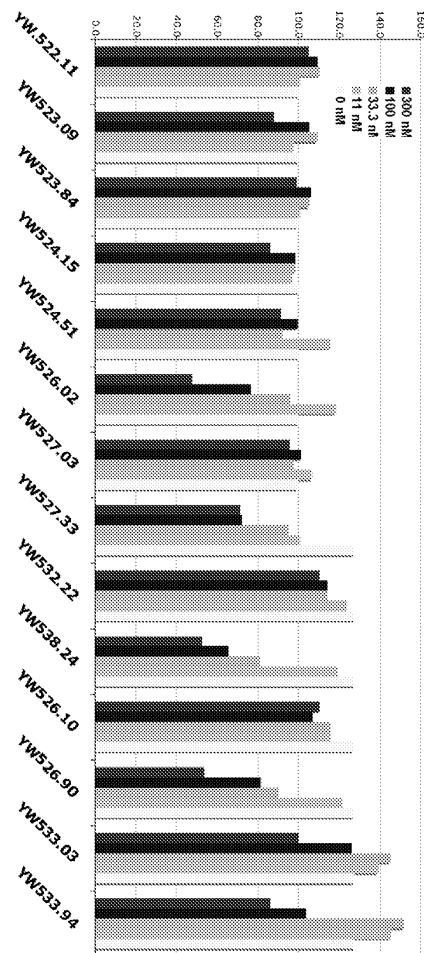


도면5

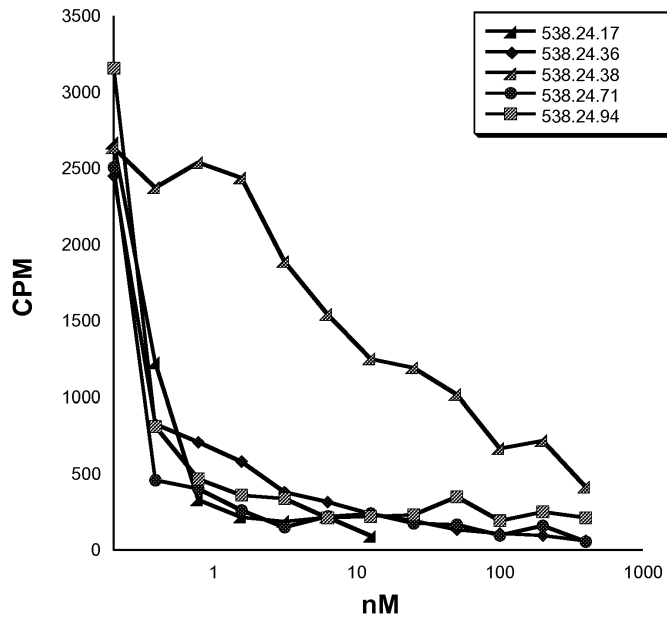


도면6

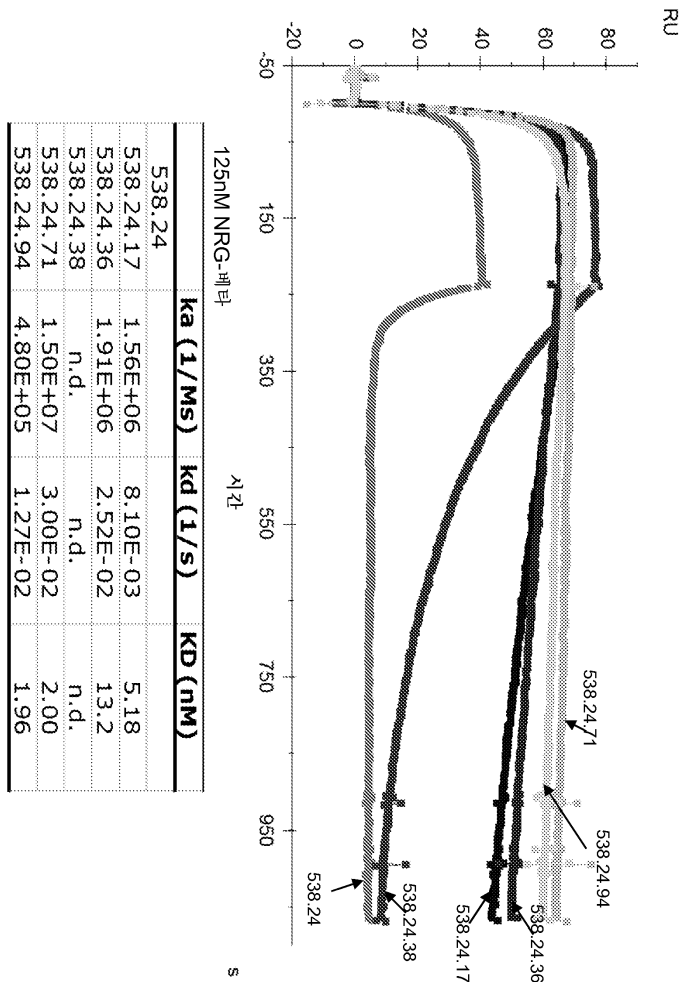
% 대조군 결합



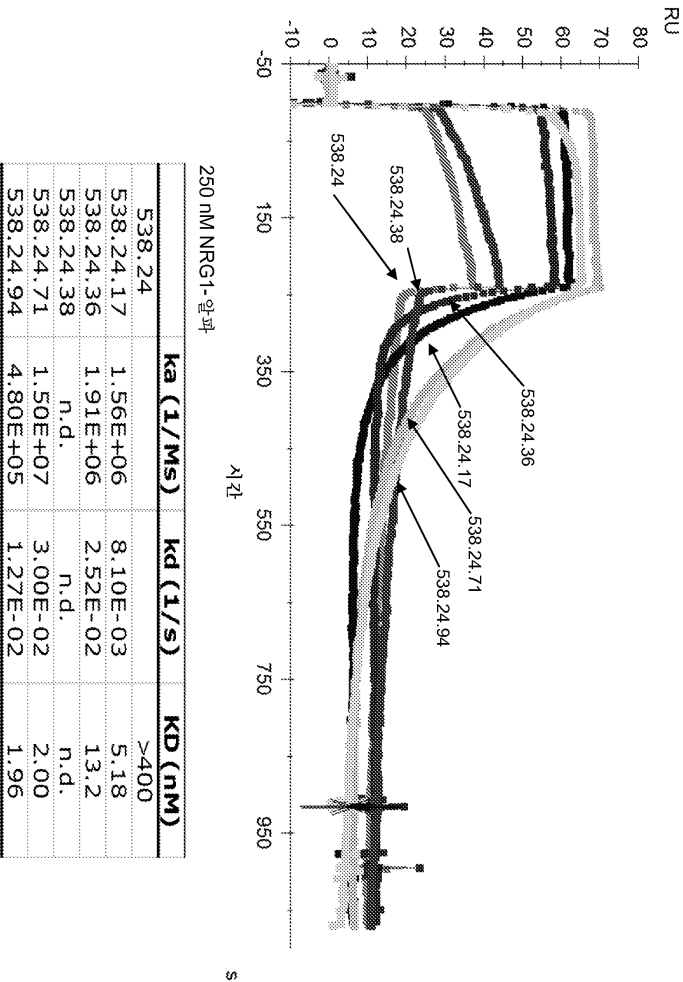
도면7



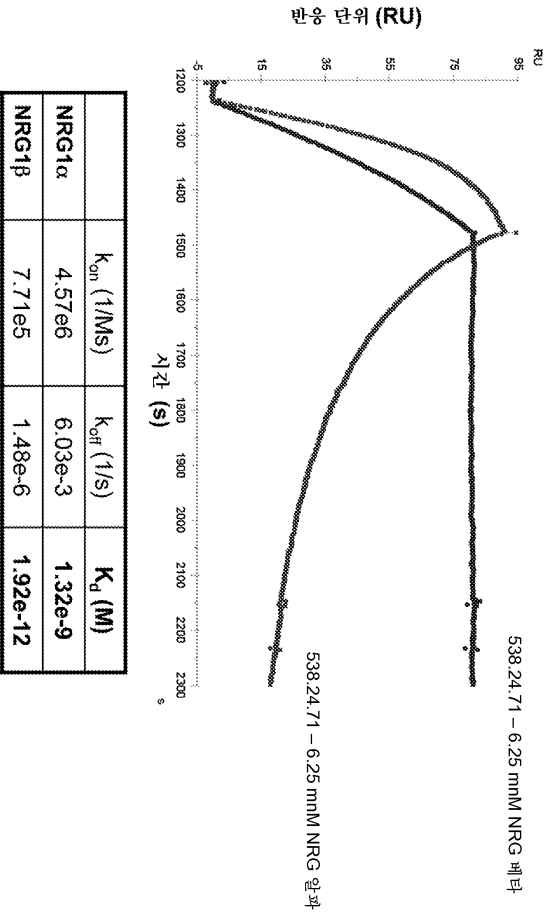
도면8



도면9

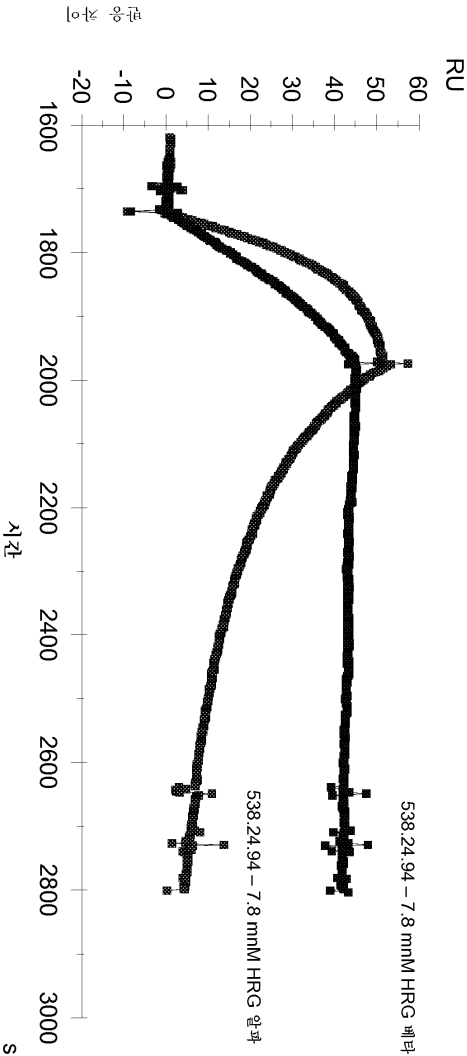


도면10

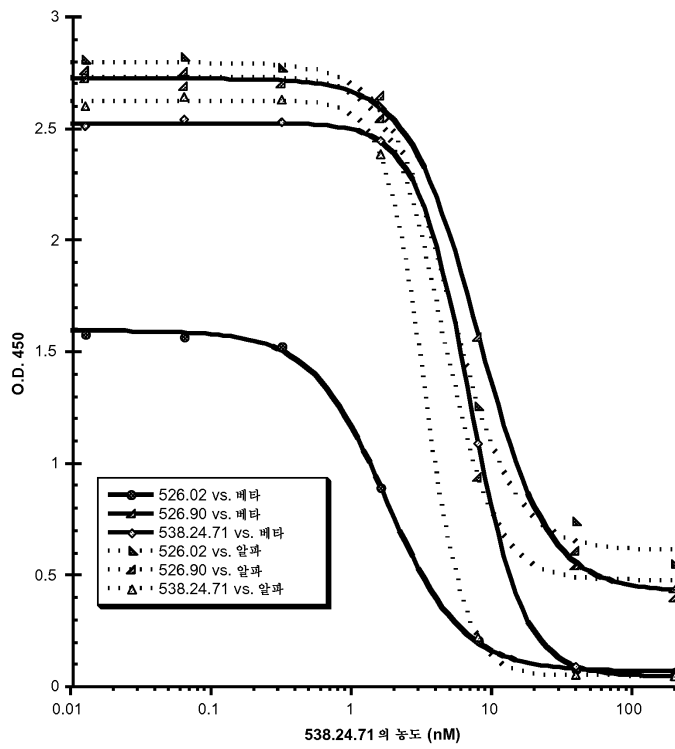


도면11

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
HRG-알파	3.87e6	6.74e-3	1.74e-9
HRG-베타	6.74e5	7.34e-5	1.09e-10



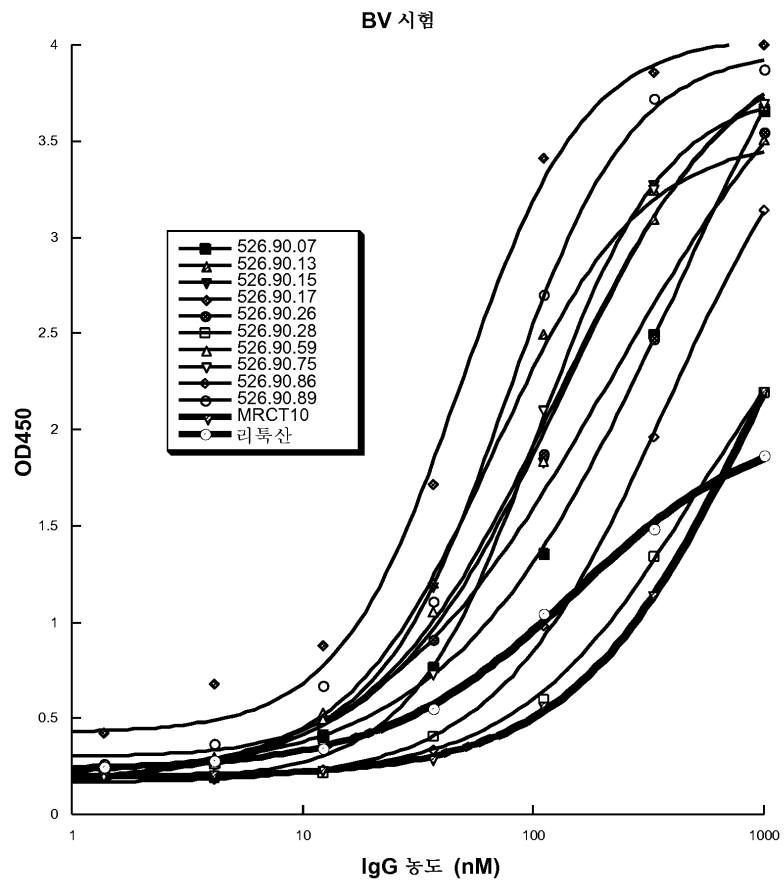
도면12



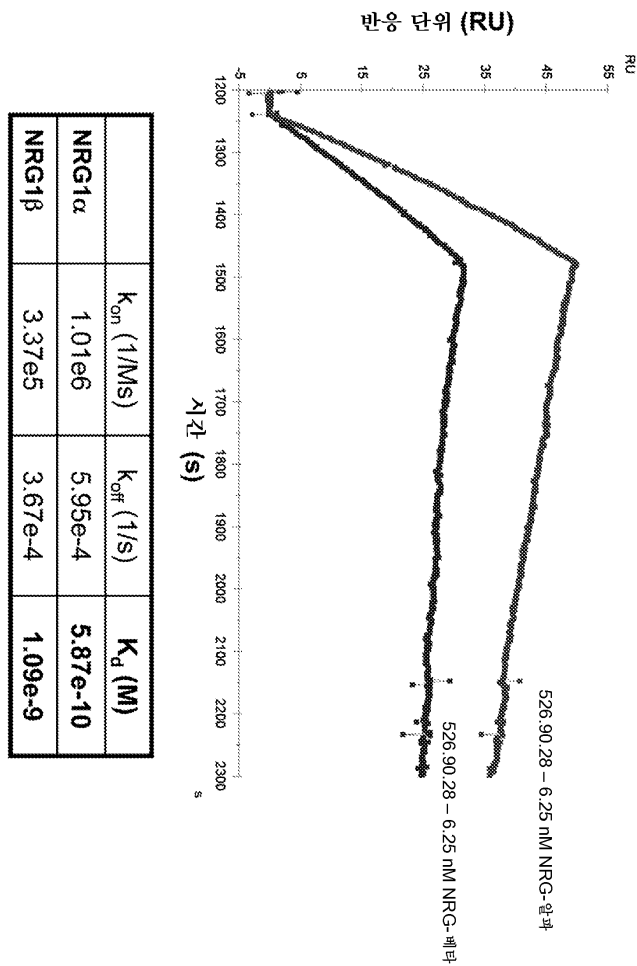
도면13

KIRA 검정: MCF7 세포, 항-HER3 Ab 포획됨							
xNRG Ab	샘플 ID	차단 NRG-a (@0.5 nM)			차단 NRG-b (@0.2 nM)		
		IC50 (nM)			IC50 (nM)		
1	526.90.07	22.4	+ 10.8	+	3.7	+ 1.3	++
2	526.90.13	9.0	+ 1.3	+++	2.4	+ 0.5	+++
3	526.90.15	16.2	+ 5.0	++	13.6	+ 5.0	+
4	526.90.17	11.8	+ 2.1	++	8.5	+ 3.1	+
5	526.90.26	19.6	+ 4.2	++	1.8	+ 1.0	+++
6	526.90.28	13.9	+ 4.8	++	1.1	+ 0.5	+++
7	526.90.59	11.6	+ 3.2	++	0.1	+ 0.1	++++
8	526.90.75	23.9	+ 7.7	+	8.6	+ 2.3	+
9	526.90.86	13.0	+ 6.8	++	10.0	+ 4.6	+
10	526.90.89	9.6	+ 1.4	+++	0.6	+ 0.1	+++
11	538.24.71	14.0	+ 2.8	++	0.1	+ 0.0	++++
12	526.90 모	n/a	+ n/a	+	n/a	+ n/a	+/-

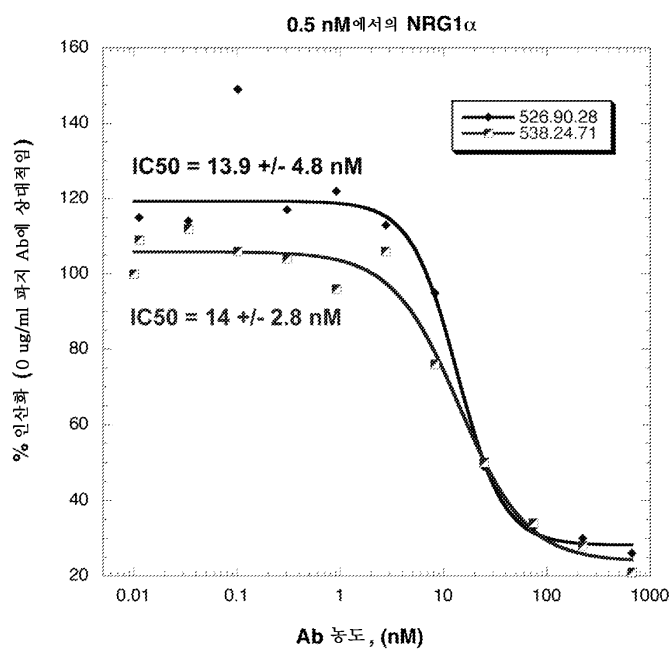
도면14



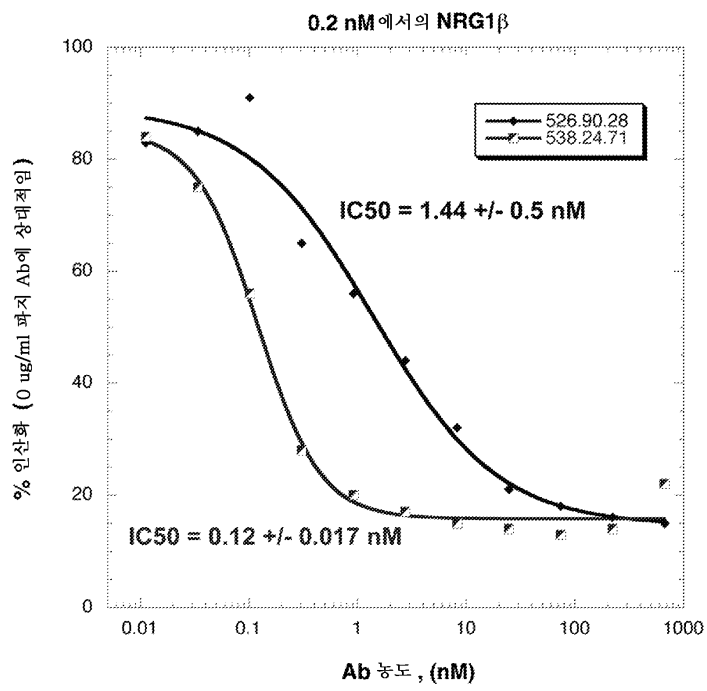
도면15



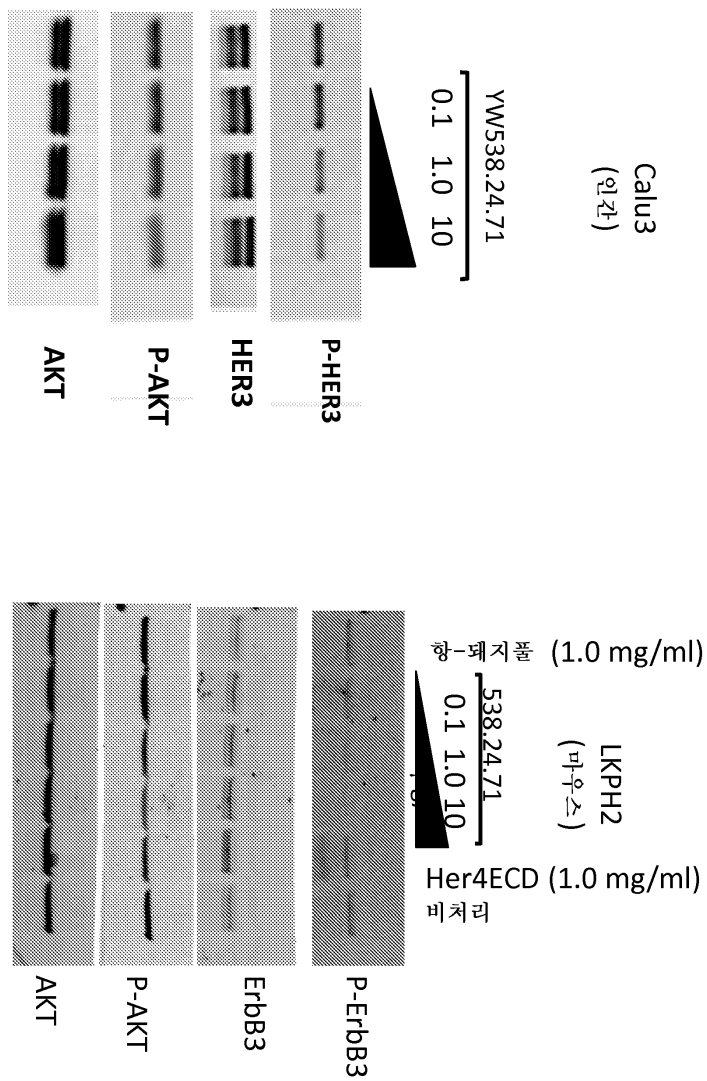
도면16



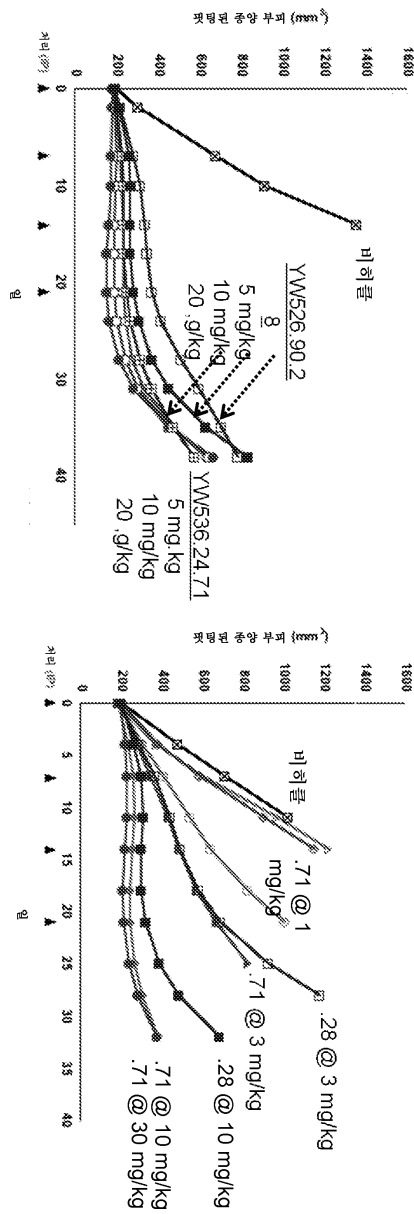
도면17



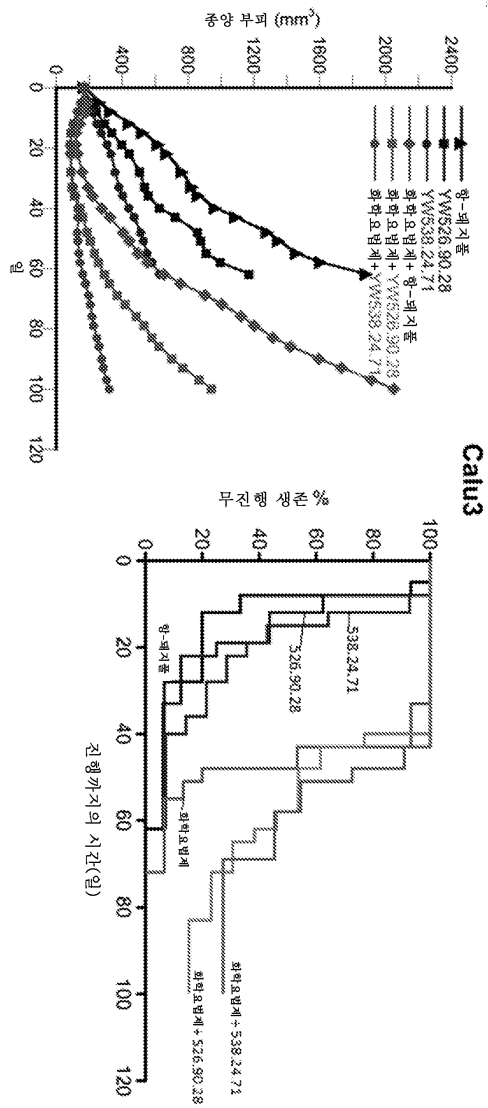
도면18



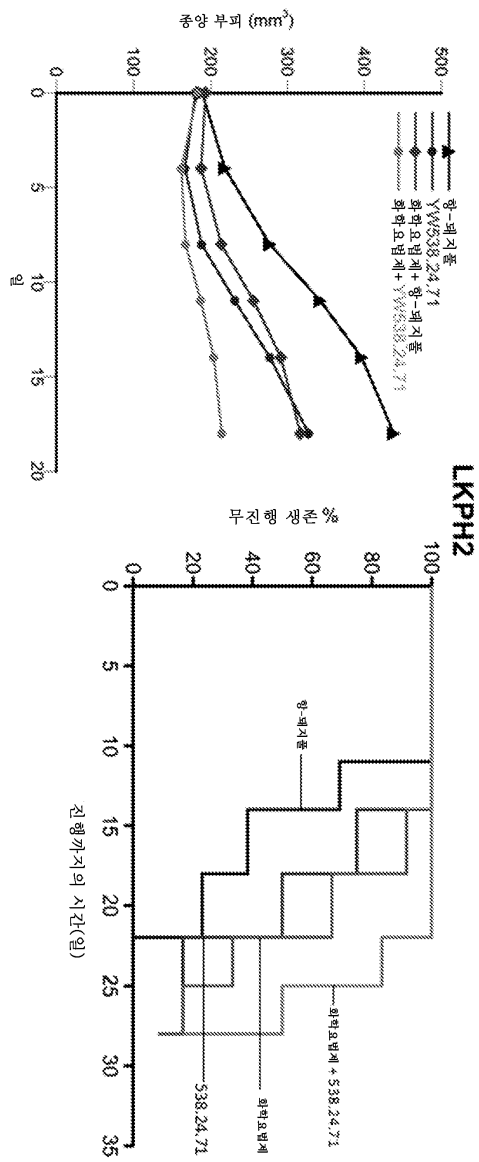
도면19



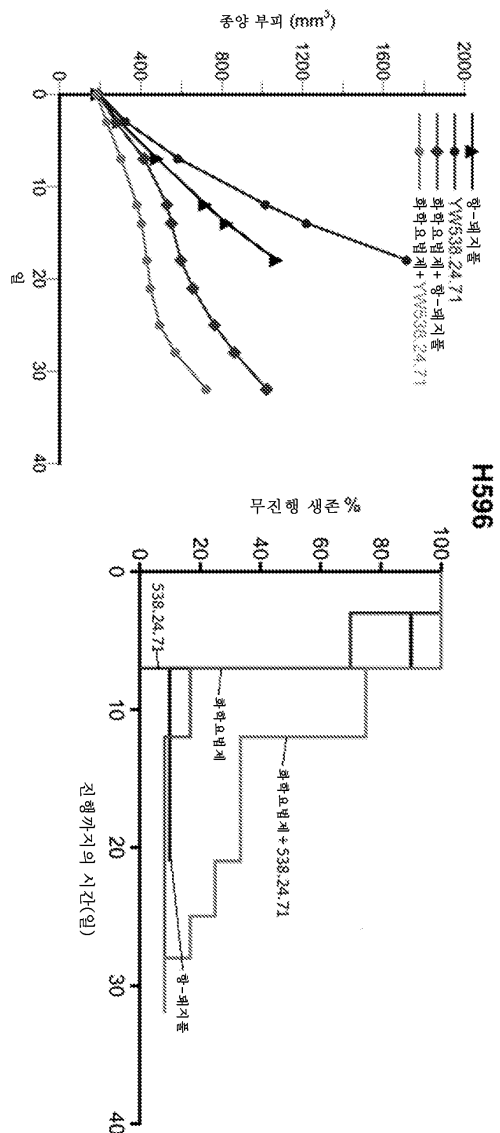
도면20



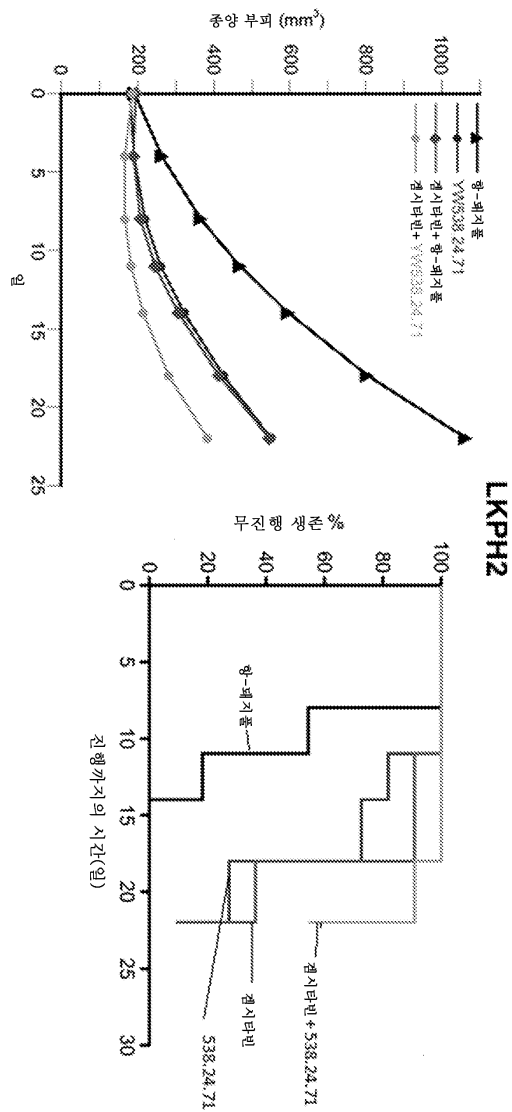
도면21



도면22

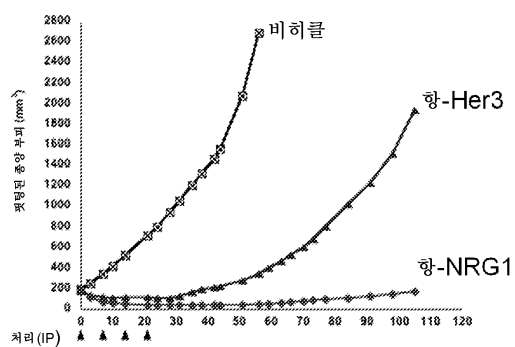


도면23



도면24a

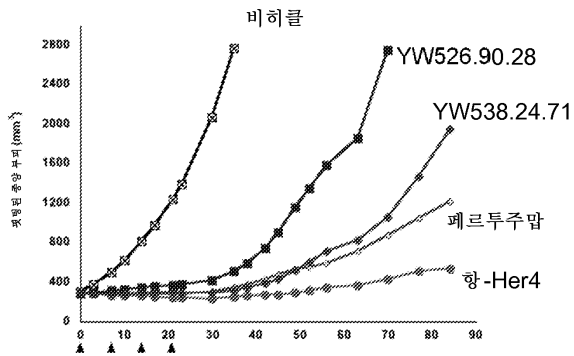
MDA-MB 유방암 모델



% TGI (제 56일)
0
101
115

도면24b

H522 NSCLC 모델



% TGI
(제 35일)

0
91
100
100
100
105

처리 IP

도면25

카비트#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	A	B	36	37	38	39	40		
538.24	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	S	G	I	W	I	H	-	-	-	-	W	V	R	Q	A	A
538.2417	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	S	G	I	W	I	H	-	-	-	-	W	V	R	Q	A	A
538.2436	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	S	G	I	W	I	H	-	-	-	-	W	V	R	Q	A	A
538.2438	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	S	G	I	W	I	H	-	-	-	-	W	V	R	Q	A	A
538.2471	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	S	G	I	W	I	H	-	-	-	-	W	V	R	Q	A	A
538.2494	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	S	G	I	W	I	H	-	-	-	-	W	V	R	Q	A	A

카비트#	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	A	B	C	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	
538.24	P	G	K	G	L	E	W	V	A	A	I	T	P	-	-	A	D	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	Y
538.2417	P	G	K	G	L	E	W	V	A	A	I	T	P	-	-	A	D	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	Y
538.2436	P	G	K	G	L	E	W	V	A	A	I	T	P	-	-	A	D	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	Y
538.2438	P	G	K	G	L	E	W	V	A	A	I	T	P	-	-	A	D	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	Y
538.2471	P	G	K	G	L	E	W	V	A	A	I	T	P	-	-	A	D	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	Y
538.2494	P	G	K	G	L	E	W	V	A	A	I	T	P	-	-	A	D	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	Y

카비트#	80	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	E	F	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	
538.24	L	Q	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	T	V	M	F	A	-	-	-	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	L	V	T	Y	S	S	S	S	S	S	S	
538.2417	L	Q	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	T	V	M	F	A	-	-	-	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	L	V	T	Y	S	S	S	S	S	S	S	S
538.2436	L	Q	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	T	V	M	F	A	-	-	-	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	L	V	T	Y	S	S	S	S	S	S	S	S
538.2438	L	Q	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	T	V	M	F	A	-	-	-	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	L	V	T	Y	S	S	S	S	S	S	S	S
538.2471	L	Q	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	T	V	M	F	A	-	-	-	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	L	V	T	Y	S	S	S	S	S	S	S	S
538.2494	L	Q	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	T	V	M	F	A	-	-	-	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	L	V	T	Y	S	S	S	S	S	S	S	S

도면26

[illegible]

도면27

카바인#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40		
526.9	E	V	Q	L	I	V	E	S	C	G	C	L	I	V	Q	P	G	C	S	L	R	L	S	C	A	A	S	C	F	S	C	N	A	M	S	-	-	W	T	R	Q	A
526.90.07	E	V	Q	L	I	V	E	S	C	G	C	L	I	V	Q	P	G	C	S	L	R	L	S	C	A	A	S	C	F	S	C	N	A	M	S	-	-	W	T	R	Q	A
526.90.13	E	V	Q	L	I	V	E	S	C	G	C	L	I	V	Q	P	G	C	S	L	R	L	S	C	A	A	S	C	F	S	C	N	A	M	S	-	-	W	T	R	Q	A
526.90.15	E	V	Q	L	I	V	E	S	C	G	C	L	I	V	Q	P	G	C	S	L	R	L	S	C	A	A	S	C	F	S	C	N	A	M	S	-	-	W	T	R	Q	A
526.90.17	E	V	Q	L	I	V	E	S	C	G	C	L	I	V	Q	P	G	C	S	L	R	L	S	C	A	A	S	C	F	S	C	N	A	M	S	-	-	W	T	R	Q	A
526.90.26	E	V	Q	L	I	V	E	S	C	G	C	L	I	V	Q	P	G	C	S	L	R	L	S	C	A	A	S	C	F	S	C	N	A	M	S	-	-	W	T	R	Q	A
526.90.28	E	V	Q	L	I	V	E	S	C	G	C	L	I	V	Q	P	G	C	S	L	R	L	S	C	A	A	S	C	F	S	C	N	A	M	S	-	-	W	T	R	Q	A
526.90.29	E	V	Q	L	I	V	E	S	C	G	C	L	I	V	Q	P	G	C	S	L	R	L	S	C	A	A	S	C	F	S	C	N	A	M	S	-	-	W	T	R	Q	A
526.90.75	E	V	Q	L	I	V	E	S	C	G	C	L	I	V	Q	P	G	C	S	L	R	L	S	C	A	A	S	C	F	S	C	N	A	M	S	-	-	W	T	R	Q	A
526.90.86	E	V	Q	L	I	V	E	S	C	G	C	L	I	V	Q	P	G	C	S	L	R	L	S	C	A	A	S	C	F	S	C	N	A	M	S	-	-	W	T	R	Q	A
526.90.89	E	V	Q	L	I	V	E	S	C	G	C	L	I	V	Q	P	G	C	S	L	R	L	S	C	A	A	S	C	F	S	C	N	A	M	S	-	-	W	T	R	Q	A
카바인#	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79			
526.9	P	C	K	C	L	E	W	Y	S	W	I	Y	P	-	-	S	C	G	N	T	Y	A	D	S	Y	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	
526.90.07	P	C	K	C	L	E	W	Y	S	W	I	Y	P	-	-	S	C	G	N	T	Y	A	D	S	Y	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	
526.90.13	P	C	K	C	L	E	W	Y	S	W	I	Y	P	-	-	S	C	G	N	T	Y	A	D	S	Y	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	
526.90.15	P	C	K	C	L	E	W	Y	S	W	I	Y	P	-	-	S	C	G	N	T	Y	A	D	S	Y	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	
526.90.17	P	C	K	C	L	E	W	Y	S	W	I	Y	P	-	-	S	C	G	N	T	Y	A	D	S	Y	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	
526.90.26	P	C	K	C	L	E	W	Y	S	W	I	Y	P	-	-	S	C	G	N	T	Y	A	D	S	Y	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	
526.90.28	P	C	K	C	L	E	W	Y	S	W	I	Y	P	-	-	S	C	G	N	T	Y	A	D	S	Y	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	
526.90.29	P	C	K	C	L	E	W	Y	S	W	I	Y	P	-	-	S	C	G	N	T	Y	A	D	S	Y	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	
526.90.75	P	C	K	C	L	E	W	Y	S	W	I	Y	P	-	-	S	C	G	N	T	Y	A	D	S	Y	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	
526.90.86	P	C	K	C	L	E	W	Y	S	W	I	Y	P	-	-	S	C	G	N	T	Y	A	D	S	Y	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	
526.90.89	P	C	K	C	L	E	W	Y	S	W	I	Y	P	-	-	S	C	G	N	T	Y	A	D	S	Y	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	
카바인#	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118			
526.9	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	S	Y	I	L	S	Y	P	S	I	T	W	A	F	D	Y	W	G	Q	C	T	L	Y	T	Y	S
526.90.07	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	S	Y	I	L	S	Y	P	S	I	T	W	A	F	D	Y	W	G	Q	C	T	L	Y	T	Y	S
526.90.13	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	S	Y	I	L	S	Y	P	S	I	T	W	A	F	D	Y	W	G	Q	C	T	L	Y	T	Y	S
526.90.15	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	S	Y	I	L	S	Y	P	S	I	T	W	A	F	D	Y	W	G	Q	C	T	L	Y	T	Y	S
526.90.17	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	S	Y	I	L	S	Y	P	S	I	T	W	A	F	D	Y	W	G	Q	C	T	L	Y	T	Y	S
526.90.26	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	S	Y	I	L	S	Y	P	S	I	T	W	A	F	D	Y	W	G	Q	C	T	L	Y	T	Y	S
526.90.28	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	S	Y	I	L	S	Y	P	S	I	T	W	A	F	D	Y	W	G	Q	C	T	L	Y	T	Y	S
526.90.29	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	S	Y	I	L	S	Y	P	S	I	T	W	A	F	D	Y	W	G	Q	C	T	L	Y	T	Y	S
526.90.75	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	S	Y	I	L	S	Y	P	S	I	T	W	A	F	D	Y	W	G	Q	C	T	L	Y	T	Y	S
526.90.86	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	S	Y	I	L	S	Y	P	S	I	T	W	A	F	D	Y	W	G	Q	C	T	L	Y	T	Y	S
526.90.89	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	S	Y	I	L	S	Y	P	S	I	T	W	A	F	D	Y	W	G	Q	C	T	L	Y	T	Y	S

도면28

[illegible]

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

- <110> GENENTECH, INC. et al.
- <120> NEUREGULIN ANTIBODIES AND USES THEREOF
- <130> P4727R1-WO
- <150> US 61/524,421
- <151> 2011-08-17
- <160> 86
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 640
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ser Glu Arg Lys Glu Gly Arg Gly Lys Gly Lys Gly Lys Lys Lys

1 5 10 15

Glu Arg Gly Ser Gly Lys Lys Pro Glu Ser Ala Ala Gly Ser Gln Ser

20 25 30

Pro Ala Leu Pro Pro Arg Leu Lys Glu Met Lys Ser Gln Glu Ser Ala

35 40 45

Ala Gly Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser

50 55 60

Ser Leu Arg Phe Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu Asn Arg Lys

65 70 75 80

Asn Lys Pro Gln Asn Ile Lys Ile Gln Lys Lys Pro Gly Lys Ser Glu

85 90 95

Leu Arg Ile Asn Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys

100 105 110

Lys Val Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr

115 120 125

Ile Val Glu Ser Asn Glu Ile Ile Thr Gly Met Pro Ala Ser Thr Glu

130 135 140

Gly Ala Tyr Val Ser Ser Glu Ser Pro Ile Arg Ile Ser Val Ser Thr

145 150 155 160

Glu Gly Ala Asn Thr Ser Ser Ser Thr Ser Thr Ser Thr Thr Gly Thr

165 170 175

Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn

180 185 190

Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr

195 200 205

Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn

210 215 220

Val Pro Met Lys Val Gln Asn Gln Glu Lys Ala Glu Glu Leu Tyr Gln

225 230 235 240

Lys Arg Val Leu Thr Ile Thr Gly Ile Cys Ile Ala Leu Leu Val Val
 245 250 255
 Gly Ile Met Cys Val Val Ala Tyr Cys Lys Thr Lys Lys Gln Arg Lys
 260 265 270
 Lys Leu His Asp Arg Leu Arg Gln Ser Leu Arg Ser Glu Arg Asn Asn
 275 280 285

 Thr Met Asn Ile Ala Asn Gly Pro His His Pro Asn Pro Pro Pro Glu
 290 295 300
 Asn Val Gln Leu Val Asn Gln Tyr Val Ser Lys Asn Val Ile Ser Ser
 305 310 315 320
 Glu His Ile Val Glu Arg Glu Ala Glu Thr Ser Phe Ser Thr Ser His
 325 330 335
 Tyr Thr Ser Thr Ala His His Ser Thr Thr Val Thr Gln Thr Pro Ser
 340 345 350

 His Ser Trp Ser Asn Gly His Thr Glu Ser Ile Leu Ser Glu Ser His
 355 360 365
 Ser Val Ile Val Met Ser Ser Val Glu Asn Ser Arg His Ser Ser Pro
 370 375 380
 Thr Gly Gly Pro Arg Gly Arg Leu Asn Gly Thr Gly Gly Pro Arg Glu
 385 390 395 400
 Cys Asn Ser Phe Leu Arg His Ala Arg Glu Thr Pro Asp Ser Tyr Arg
 405 410 415

 Asp Ser Pro His Ser Glu Arg Tyr Val Ser Ala Met Thr Thr Pro Ala
 420 425 430
 Arg Met Ser Pro Val Asp Phe His Thr Pro Ser Ser Pro Lys Ser Pro
 435 440 445
 Pro Ser Glu Met Ser Pro Pro Val Ser Ser Met Thr Val Ser Met Pro
 450 455 460
 Ser Met Ala Val Ser Pro Phe Met Glu Glu Glu Arg Pro Leu Leu Leu
 465 470 475 480

 Val Thr Pro Pro Arg Leu Arg Glu Lys Lys Phe Asp His His Pro Gln

485 490 495
 Gln Phe Ser Ser Phe His His Asn Pro Ala His Asp Ser Asn Ser Leu
 500 505 510
 Pro Ala Ser Pro Leu Arg Ile Val Glu Asp Glu Glu Tyr Glu Thr Thr
 515 520 525
 Gln Glu Tyr Glu Pro Ala Gln Glu Pro Val Lys Lys Leu Ala Asn Ser
 530 535 540

 Arg Arg Ala Lys Arg Thr Lys Pro Asn Gly His Ile Ala Asn Arg Leu
 545 550 555 560
 Glu Val Asp Ser Asn Thr Ser Ser Gln Ser Ser Asn Ser Glu Ser Glu
 565 570 575
 Thr Glu Asp Glu Arg Val Gly Glu Asp Thr Pro Phe Leu Gly Ile Gln
 580 585 590
 Asn Pro Leu Ala Ala Ser Leu Glu Ala Thr Pro Ala Phe Arg Leu Ala
 595 600 605

 Asp Ser Arg Thr Asn Pro Ala Gly Arg Phe Ser Thr Gln Glu Glu Ile
 610 615 620
 Gln Ala Arg Leu Ser Ser Val Ile Ala Asn Gln Asp Pro Ile Ala Val
 625 630 635 640
 <210> 2
 <211> 645
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Met Ser Glu Arg Lys Glu Gly Arg Gly Lys Gly Lys Gly Lys Lys Lys
 1 5 10 15
 Glu Arg Gly Ser Gly Lys Lys Pro Glu Ser Ala Ala Gly Ser Gln Ser

 20 25 30
 Pro Ala Leu Pro Pro Arg Leu Lys Glu Met Lys Ser Gln Glu Ser Ala
 35 40 45
 Ala Gly Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser
 50 55 60

Ser	Leu	Arg	Phe	Lys	Trp	Phe	Lys	Asn	Gly	Asn	Glu	Leu	Asn	Arg	Lys
65				70				75				80			
Asn	Lys	Pro	Gln	Asn	Ile	Lys	Ile	Gln	Lys	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Glu
85				90				95							
Leu	Arg	Ile	Asn	Lys	Ala	Ser	Leu	Ala	Asp	Ser	Gly	Glu	Tyr	Met	Cys
100				105				110							
Lys	Val	Ile	Ser	Lys	Leu	Gly	Asn	Asp	Ser	Ala	Ser	Ala	Asn	Ile	Thr
115				120				125							
Ile	Val	Glu	Ser	Asn	Glu	Ile	Ile	Thr	Gly	Met	Pro	Ala	Ser	Thr	Glu
130				135				140							
Gly	Ala	Tyr	Val	Ser	Ser	Glu	Ser	Pro	Ile	Arg	Ile	Ser	Val	Ser	Thr
145				150				155				160			
Glu	Gly	Ala	Asn	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Thr	Gly	Thr
165				170				175							
Ser	His	Leu	Val	Lys	Cys	Ala	Glu	Lys	Glu	Lys	Thr	Phe	Cys	Val	Asn
180				185				190							
Gly	Gly	Glu	Cys	Phe	Met	Val	Lys	Asp	Leu	Ser	Asn	Pro	Ser	Arg	Tyr
195				200				205							
Leu	Cys	Lys	Cys	Pro	Asn	Glu	Phe	Thr	Gly	Asp	Arg	Cys	Gln	Asn	Tyr
210				215				220							
Val	Met	Ala	Ser	Phe	Tyr	Lys	His	Leu	Gly	Ile	Glu	Phe	Met	Glu	Ala
225				230				235				240			
Glu	Glu	Leu	Tyr	Gln	Lys	Arg	Val	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Ile	Cys	Ile
245				250				255							
Ala	Leu	Leu	Val	Val	Gly	Ile	Met	Cys	Val	Val	Ala	Tyr	Cys	Lys	Thr
260				265				270							
Lys	Lys	Gln	Arg	Lys	Lys	Leu	His	Asp	Arg	Leu	Arg	Gln	Ser	Leu	Arg
275				280				285							
Ser	Glu	Arg	Asn	Asn	Met	Met	Asn	Ile	Ala	Asn	Gly	Pro	His	His	Pro
290				295				300							
Asn	Pro	Pro	Pro	Glu	Asn	Val	Gln	Leu	Val	Asn	Gln	Tyr	Val	Ser	Lys

305 310 315 320
 Asn Val Ile Ser Ser Glu His Ile Val Glu Arg Glu Ala Glu Thr Ser
 325 330 335
 Phe Ser Thr Ser His Tyr Thr Ser Thr Ala His His Ser Thr Thr Val

 340 345 350
 Thr Gln Thr Pro Ser His Ser Trp Ser Asn Gly His Thr Glu Ser Ile
 355 360 365
 Leu Ser Glu Ser His Ser Val Ile Val Met Ser Ser Val Glu Asn Ser
 370 375 380
 Arg His Ser Ser Pro Thr Gly Gly Pro Arg Gly Arg Leu Asn Gly Thr
 385 390 395 400
 Gly Gly Pro Arg Glu Cys Asn Ser Phe Leu Arg His Ala Arg Glu Thr

 405 410 415
 Pro Asp Ser Tyr Arg Asp Ser Pro His Ser Glu Arg Tyr Val Ser Ala
 420 425 430
 Met Thr Thr Pro Ala Arg Met Ser Pro Val Asp Phe His Thr Pro Ser
 435 440 445
 Ser Pro Lys Ser Pro Pro Ser Glu Met Ser Pro Pro Val Ser Ser Met
 450 455 460
 Thr Val Ser Met Pro Ser Met Ala Val Ser Pro Phe Met Glu Glu Glu

 465 470 475 480
 Arg Pro Leu Leu Leu Val Thr Pro Pro Arg Leu Arg Glu Lys Lys Phe
 485 490 495
 Asp His His Pro Gln Gln Phe Ser Ser Phe His His Asn Pro Ala His
 500 505 510
 Asp Ser Asn Ser Leu Pro Ala Ser Pro Leu Arg Ile Val Glu Asp Glu
 515 520 525
 Glu Tyr Glu Thr Thr Gln Glu Tyr Glu Pro Ala Gln Glu Pro Val Lys

 530 535 540
 Lys Leu Ala Asn Ser Arg Arg Ala Lys Arg Thr Lys Pro Asn Gly His
 545 550 555 560

Ile Ala Asn Arg Leu Glu Val Asp Ser Asn Thr Ser Ser Gln Ser Ser
565 570 575

Asn Ser Glu Ser Glu Thr Glu Asp Glu Arg Val Gly Glu Asp Thr Pro
580 585 590

Phe Leu Gly Ile Gln Asn Pro Leu Ala Ala Ser Leu Glu Ala Thr Pro

595 600 605
Ala Phe Arg Leu Ala Asp Ser Arg Thr Asn Pro Ala Gly Arg Phe Ser
610 615 620

Thr Gln Glu Glu Ile Gln Ala Arg Leu Ser Ser Val Ile Ala Asn Gln
625 630 635 640

Asp Pro Ile Ala Val
645

<210> 3

<211> 65

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
1 5 10 15

Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
20 25 30

Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn
35 40 45

Val Pro Met Lys Val Gln Asn Gln Glu Lys Ala Glu Glu Leu Tyr Gln
50 55 60

Lys

65

<210> 4

<211> 71

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Thr Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val

1 5 10 15
 Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg
 20 25 30
 Tyr Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn
 35 40 45
 Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys His Leu Gly Ile Glu Phe Met Glu
 50 55 60
 Ala Glu Glu Leu Tyr Gln Lys
 65 70

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-H1

<400> 5

Gly Phe Thr Phe Ser Gly Thr Trp Ile His

1 5 10

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-H2

<400> 6

Ala Ile Thr Pro Ala Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-H3

<400

> 7

Tyr Met Phe Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-L1

<400> 8

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-L2

<400> 9

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-L3

<400> 10

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr

1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-L3

<400> 11

Gln Gln Ser Tyr Trp Met Pro Pro Thr

1 5

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-L1

<400> 12

Arg Ala Ser Gln Asn Val Asp Arg Ser Leu Ala

1 5 10

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> HVR-L2

<400> 13

Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-L3

<400> 14

Gln Gln His Tyr Thr Leu Pro Phe Thr

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-L3

<400> 15

Gln Gln Ser Tyr Thr Ile Pro Met Thr

1 5

<210> 16
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223>
 > HVR-L1
 <400> 16
 Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Ser Leu Ala
 1 5 10
 <210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HVR-L2
 <400> 17
 Gly Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5
 <210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HVR-L3
 <400> 18
 Gln Gln His Tyr Thr Leu Pro Phe Thr
 1 5
 <210> 19
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HVR-L1
 <400> 19
 Arg Ala Ser Gln Asp Val Lys Lys Ser Leu Ala
 1 5 10
 <210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-L3

<400> 20

Gln Gln His Tyr Thr Leu Pro Leu Thr

1 5

<210> 21

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain variable region

<400> 21

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Thr

20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Ala Ile Thr Pro Ala Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Thr Tyr Met Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 22

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain variable region

<400> 22

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 23

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain variable region

<400> 23

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Trp Met Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 24

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain variable region

<400> 24

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Val Asp Arg Ser

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Leu Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 25

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain variable region

<400> 25

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Ile Pro Met
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105
<210> 26
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Light chain variable region
<400> 26

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Ser
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Leu Pro Phe
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 27

<

211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain variable region

<400> 27

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Lys Lys Ser

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Leu Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-H1

<400> 28

Gly Phe Thr Phe Ser Gly Asn Ala Met Ser

1 5 10

<210> 29

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-H2

<400> 29

Trp Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-H3

<400> 30

Ser Tyr Ile Leu Ser Tyr Pro Ser Ile Thr Trp Ala Phe Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 31

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-L1

<400> 31

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-L2

<400> 32

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ser

1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR- L3

<400> 33

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Ile Thr

1 5

<210> 34

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-H1

<400> 34

Gly Phe Ser Phe Ser Gly Ile Ala Met Ser

1 5 10

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-L3

<400> 35

Gln Gln Ala Phe Ser Thr Pro Ile Thr

1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-L3

<400> 36

Gln Gln Ser Phe Leu Ser Pro Ile Thr

1 5

<210> 37

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-H1

<400> 37

Gly Phe Ser Phe Thr Gly Ile Ala Met Ser

1 5 10

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-L3

<400> 38

Gln Gln Ala Tyr Leu Thr Pro Val Thr

1 5

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-H1

<400> 39

Gly Phe Thr Phe Thr Gly Lys Ala Met Ser

1 5 10

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-L3

<400> 40

Gln Gln Ala Phe Ile Ser Pro Ile Thr

1 5

<210> 41

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR- H1

<400> 41

Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ile Ala Ile Ala

1 5 10

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-H3

<400> 42

Ala Tyr Ile Leu Asp Asn Thr Ser Ile Thr Trp Ala Phe Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 43

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR- H3

<400> 43

Ser Tyr Ile Leu Ser Gln Lys Ser Ala Thr Trp Ala Phe Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 44

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-H3

<400> 44

Ser Tyr Ile Leu Asp Tyr Arg Phe Phe Thr Trp Ala Phe Asp Tyr

1 5 10 15

<

210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-L3

<400> 45

Gln Gln Gly Phe Ser Thr Pro Ile Thr

1 5

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-L2

<400> 46

Gly Ala Ser Ser Leu Ala Ser

1 5

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-L3

<400> 47

Gln Gln Ala Phe Leu Ser Pro Ile Thr

1 5

<210>

48

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-H3

<400> 48

Ser Tyr Ile Leu Ser Tyr Glu Thr Ser Thr Trp Ala Phe Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR- L2

<400> 49

Gly Ala Ser Ser Leu Asp Ser

1 5

<210> 50

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-H3

<400> 50

Ser Tyr Ile Leu Leu His Leu Ser Ala Thr Trp Ala Phe Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-L3

<400> 51

Gln Gln Ala Tyr Leu Ser Pro Ile Thr

1 5

<210> 52

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain variable region

<400> 52

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Asn

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Trp Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Tyr Ile Leu Ser Tyr Pro Ser Ile Thr Trp Ala Phe Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 53

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain variable region

<400> 53

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 54

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain variable region

<400> 54

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Gly Ile

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Trp Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Tyr Ile Leu Ser Tyr Pro Ser Ile Thr Trp Ala Phe Asp

100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 55

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain variable region

<400> 55

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Phe Ser Thr Pro Ile

	85	90	95
Thr	Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg		
	100	105	
<210> 56			
<211> 124			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> Heavy chain variable region			
<400> 56			
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Gly Ile			
	20	25	30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45
Ser Trp Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
	50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			

	85	90	95
Ala Arg Ser Tyr Ile Leu Ser Tyr Pro Ser Ile Thr Trp Ala Phe Asp			
	100	105	110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	115	120	
<210> 57			
<211> 108			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> Light chain variable region			
<400> 57			
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe Leu Ser Pro Ile

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 58

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain variable region

<400> 58

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Thr Gly Ile

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Trp Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Tyr Ile Leu Ser Tyr Pro Ser Ile Thr Trp Ala Phe Asp
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 59

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain variable region

<400> 59

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Tyr Leu Thr Pro Val
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 60

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain variable region

<400> 60

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Gly Lys

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Trp Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Tyr Ile Leu Ser Tyr Pro Ser Ile Thr Trp Ala Phe Asp

100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 61

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain variable region

<400> 61

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Phe Ile Ser Pro Ile

85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105
<210> 62
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Heavy chain variable region
<400> 62
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ile
20 25 30
Ala Ile Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
Ala Arg Ala Tyr Ile Leu Asp Asn Thr Ser Ile Thr Trp Ala Phe Asp
100 105 110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 63
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Heavy chain variable region
<400> 63
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ile

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Trp Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Tyr Ile Leu Ser Gln Lys Ser Ala Thr Trp Ala Phe Asp

100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 64

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain variable region

<400> 64

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Asn

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Trp Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Tyr Ile Leu Asp Tyr Arg Phe Phe Thr Trp Ala Phe Asp

100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 65

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain variable region

<400> 65

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Phe Ser Thr Pro Ile

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 66

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain variable region

<400> 66

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Asn
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Trp Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Tyr Ile Leu Ser Tyr Pro Ser Ile Thr Trp Ala Phe Asp
100 105 110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 67

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain variable region

<400> 67

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Phe Leu Ser Pro Ile
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 68

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain variable region

<400> 68

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Asn
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Trp Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Tyr Ile Leu Ser Tyr Glu Thr Ser Thr Trp Ala Phe Asp
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 69

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain variable region

<400> 69

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Ile

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 70

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain variable region

<400> 70

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Asn

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Trp Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
Ala Arg Ser Tyr Ile Leu Leu His Leu Ser Ala Thr Trp Ala Phe Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 71

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain variable region

<400> 71

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Tyr Leu Ser Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 72

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain

<400> 72

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Thr
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Thr Pro Ala Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Tyr Met Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu

 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr

 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 73

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain

<400> 73

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Ser
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Leu Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 74
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Heavy chain

<400> 74

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ile

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Trp Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Tyr Ile Leu Ser Gln Lys Ser Ala Thr Trp Ala Phe Asp

100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys

115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly

130 135 140

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro

145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr

165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val

180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn

195 200 205

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro

210 215 220

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu

225 230 235 240

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275 280 285

 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290 295 300
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315 320
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 325 330 335
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340 345 350

 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 355 360 365
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 385 390 395 400
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 405 410 415

 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420 425 430
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450
 <210> 75
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain

<400> 75

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 76

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR- H1

<400> 76

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ile Ala Met Ser

1 5 10

<210> 77

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shNRG1 sense strand

<400> 77

gatcccccat ggtgaacata gcgaatttca agagaattcg ctatgttcac catgtttttt 60

ggaaa 65

<210> 78

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shNRG1 antisense strand

<400> 78

agcttttcca aaaaacatgg tgaacatagc gaattctctt gaaattcgct atgttcacca 60

tgggg 65

<210> 79

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shNRG1.2: sense strand

<400> 79

gatccccgag tatatgtgca aagtgattca agagatcact ttgcacatat actctttttt 60

ggaaa 65

<210> 80

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shNRG1.2 antisense strand

<400> 80

agcttttcca aaaaagagta tatgtgcaaa gtgatctctt gaatcacttt gcacatatac 60

tcggg 65

<210> 81

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shErbB4 sense strand

<400> 81

gatccccgat cacaactgct gcttaattca agagattaag cagcagttgt gatctttttt 60

ggaaa 65

<210> 82

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shErbB4 antisense strand

<400> 82

agcttttcca aaaaagatca caactgctgc ttaatctctt gaattaagca gcagttgtga 60

tcggg 65

<210> 83

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shErbB3 sense strand

<400> 83

gatccccaag aggatgtcaa cggttattca agagataacc gttgacatcc tctttttttt 60

ggaaa 65

<210> 84

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shErbB3 antisense strand

<400> 84

agcttttcca aaaaaaagag gatgtcaacg gttatctctt gaataaccgt tgacatcctc 60

ttggg 65

<210> 85

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse shNRG1 sense strand

<400> 85

gatacccat ggtgaacata gcgaatttca agagaattcg ctatgttcac catgtttttt 60

ggaaa 65

<210> 86

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse shNRG1 antisense strand

<400> 86

agcttttcca aaaaacatgg tgaacatagc gaattctctt gaaattcget atgttcacca 60

tgggg 65